



Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

“Evaluación de la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos, aplicando cuatro diferentes productos hormonales en el medio de maduración”.

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA.

Presenta:

Ruth Azpeitia De Lucio
Norma Ivette Reyes Oliva

Asesor

M en C. Fernando García González

Coasesor

Dr. José Alfredo Medrano Hernández



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y examen profesional**

Evaluación de la maduración in vitro de ovocitos porcinos, aplicando cuatro diferentes productos hormonales en el medio de maduración.

Que presenta la pasante: **Ruth Azpeitia De Lucio.**

Con número de cuenta: **309684536** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 01 de septiembre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

NOMBRE

PRESIDENTE

Dr. Salvador Romo García

Salvador Romo

VOCAL

Dra. María del Carmen Espejel Del Moral

SECRETARIO

M. en C. Fernando García González

1er. SUPLENTE

M.V.Z. Saúl Alejandro Rodríguez Zamora

2do. SUPLENTE

M.V.Z. Mayrem Rosalín Guerrero Chávez

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/lmcf*



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y examen profesional**

Evaluación de la maduración in vitro de ovocitos porcinos, aplicando cuatro diferentes productos hormonales en el medio de maduración.

Que presenta la pasante: **Ruth Azpeitia De Lucio.**

Con número de cuenta: **309684536** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 01 de septiembre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Salvador Romo García	
VOCAL	Dra. María del Carmen Espejel Del Moral	
SECRETARIO	M. en C. Fernando García González	
1er. SUPLENTE	M.V.Z. Saúl Alejandro Rodríguez Zamora	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Mayrem Rosalín Guerrero Chávez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS

ASUNTO: VOTO ^{SUP} ~~PROBATORIO~~ ^{PROBATORIO}



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y examen profesional**

Evaluación de la maduración in vitro de ovocitos porcinos, aplicando cuatro diferentes productos hormonales en el medio de maduración.

Que presenta la pasante: **Ruth Azpeltla De Lucio.**

Con número de cuenta: **309684536** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista.**

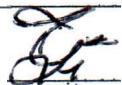
Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 01 de septiembre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Salvador Romo García	_____
VOCAL	Dra. María del Carmen Espejel Del Moral	_____
SECRETARIO	M. en C. Fernando García González	
1er. SUPLENTE	M.V.Z. Saúl Alejandro Rodríguez Zamora	_____
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Mayrem Rosalin Guerrero Chávez	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y examen profesional**

Evaluación de la maduración in vitro de ovocitos porcinos, aplicando cuatro diferentes productos hormonales en el medio de maduración.

Que presenta la pasante: **Ruth Azpeitia De Lucio.**

Con número de cuenta: **309684536** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 01 de septiembre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Salvador Romo García	_____
VOCAL	Dra. María del Carmen Espejel Del Moral	_____
SECRETARIO	M. en C. Fernando García González	_____
1er. SUPLENTE	M.V.Z. Saúl Alejandro Rodríguez Zamora	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Mayrem Rosalín Guerrero Chávez	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y examen profesional**

Evaluación de la maduración in vitro de ovocitos porcinos, aplicando cuatro diferentes productos hormonales en el medio de maduración.

Que presenta la pasante: **Ruth Azpeitia De Lucio.**
Con número de cuenta: 309684536 para obtener el Título de: Médica Veterinaria Zootecnista.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 01 de septiembre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dr. Salvador Romo García</u>	_____
VOCAL	<u>Dra. María del Carmen Espejel Del Moral</u>	_____
SECRETARIO	<u>M. en C. Fernando García González</u>	_____
1er. SUPLENTE	<u>M.V.Z. Saúl Alejandro Rodríguez Zamora</u>	_____
2do. SUPLENTE	<u>M.V.Z. Mayrem Rosalin Guerrero Chávez</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/lmcf*



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y examen profesional**

Evaluación de la maduración in vitro de ovocitos porcinos, aplicando cuatro diferentes productos hormonales en el medio de maduración.

Que presenta la pasante: **Norma Ivette Reyes Oliva.**

Con número de cuenta: **413078438** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 01 de septiembre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	
PRESIDENTE	Dr. Salvador Romo García	
VOCAL	Dra. María del Carmen Espejel Del Moral	
SECRETARIO	M. en C. Fernando García González	
1er. SUPLENTE	M.V.Z. Saúl Alejandro Rodríguez Zamora	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Mayrem Rosalin Guerrero Chávez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y examen profesional**

Evaluación de la maduración in vitro de ovocitos porcinos, aplicando cuatro diferentes productos hormonales en el medio de maduración.

Que presenta la pasante: **Norma Ivette Reyes Oliva.**

Con número de cuenta: **413078438** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 01 de septiembre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Salvador Romo García	
VOCAL	Dra. María del Carmen Espejel Del Moral	
SECRETARIO	M. en C. Fernando García González	
1er. SUPLENTE	M.V.Z. Saúl Alejandro Rodríguez Zamora	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Mayrem Rosalin Guerrero Chávez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y examen profesional**

Evaluación de la maduración in vitro de ovocitos porcinos, aplicando cuatro diferentes productos hormonales en el medio de maduración.

Que presenta la pasante: **Norma Ivette Reyes Oliva.**

Con número de cuenta: **413078438** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 01 de septiembre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Salvador Romo García	
VOCAL	Dra. María del Carmen Espejel Del Moral	
SECRETARIO	M. en C. Fernando García González	
1er. SUPLENTE	M.V.Z. Saúl Alejandro Rodríguez Zamora	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Mayrem Rosalin Guerrero Chávez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y examen profesional**

Evaluación de la maduración in vitro de ovocitos porcinos, aplicando cuatro diferentes productos hormonales en el medio de maduración.

Que presenta la pasante: **Norma Ivette Reyes Oliva.**

Con número de cuenta: **413078438** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 01 de septiembre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Salvador Romo García	
VOCAL	Dra. María del Carmen Espejel Del Moral	
SECRETARIO	M. en C. Fernando García González	
1er. SUPLENTE	M.V.Z. Saúl Alejandro Rodríguez Zamora	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Mayrem Rosalín Guerrero Chávez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y examen profesional**

Evaluación de la maduración in vitro de ovocitos porcinos, aplicando cuatro diferentes productos hormonales en el medio de maduración.

Que presenta la pasante: **Norma Ivette Reyes Oliva.**
Con número de cuenta: 413078438 para obtener el Título de: Médica Veterinaria Zootecnista.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 01 de septiembre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Salvador Romo García	_____
VOCAL	Dra. María del Carmen Espejel Del Moral	_____
SECRETARIO	M. en C. Fernando Garcia González	_____
1er. SUPLENTE	M.V.Z. Saúl Alejandro Rodríguez Zamora	_____
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Mayrem Rosalin Guerrero Chávez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/imcf*

DEDICATORIAS

Ruth

A mi madre Erika De Lucio por nunca dejarme sola y enseñarme que en la vida no hay mejor opción que seguir un camino con corazón, eres un gran ejemplo de fuerza y entereza.

A mi padre Omar Azpeitia por siempre escucharme, aconsejarme y creer en mí a pesar de lo difícil que sea la situación. Gracias por recordarme siempre, tratar de dejar un mundo mejor.

A mis hermanos Gonzalo, Isaac y Regina porque a pesar de su corta edad me enseñan a nunca perder las ganas de seguir aprendiendo y la capacidad de asombro. Gracias por siempre ser un gran motor para seguir siendo mejor persona.

A mi familia que siempre están ahí en las buenas y en las malas.

A Damián por estar a mi lado, creer en mí y apoyar mis proyectos tanto personales como profesionales.

A mis amigos Karen, Axel, Aline, Megan, Abril, Kenia, Sav y todos los que hacen está vida más divertida, gracias por formar una pequeña gran familia.

A ti Ivette por hacer un gran equipo juntas, las horas trabajando, las largas pláticas, por la gran mancuerna que formamos.

A Linus, Inka, Panchi, Tania y Lariza por acompañarme en esas largas noches de estudio.

Ivette

A mis padres, les agradezco infinitamente todo su apoyo, amor, comprensión y tolerancia con cada una de las decisiones que he tomado y por ayudarme a conseguir este gran sueño que inició desde hace mucho tiempo.

César por su guía y su consejo siempre, por escucharme y apoyarme cada que lo necesitase.

A Rick por ser mi compañero incondicional y no dejarme caer, por estar conmigo desde el inicio y guiarme en el camino y por hacerme sentir orgullosa de lo que soy.

A Ruth por unirse en este viaje conmigo, por estar conmigo en los momentos importantes, por enseñarme a no rendirme aun cuando quería abandonar todo y por todo su apoyo y cariño incondicional.

Al Doctor Fernando, la Doctora Alicia y al Doctor Medrano por darme la oportunidad, las enseñanzas y el tiempo brindado en el laboratorio.

A Julio, Daysi, Miguel, Julián, Alan por hacer del laboratorio 2 UIM un lugar feliz e inundar mis mañanas de café, pan y trabajo en equipo.

A Sam, Angie, Nelly, Toño, José Luis, Mario, Alberto, por hacer de la Universidad una experiencia inolvidable.

A VETAJ por el apoyo recibido y las enseñanzas durante todo este tiempo.

AGRADECIMIENTOS

A la máxima casa de estudios UNAM por permitirnos realizar nuestros estudios universitarios y brindarnos las herramientas necesarias para hacerlo.

A nuestros tutores M en C. Fernando García González, Dr. Alfredo Medrano por guiarnos en todo momento y compartir sus conocimientos con nosotras.

A la M en C. Alicia Alcántar Rodríguez por su paciencia y sus consejos para ser mejores médicos y seres humanos.

Al laboratorio 2 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES Cuautitlán por brindarnos los medios para la realización de este trabajo.

Al rastro TIF 194 Abastos Cuautitlán S.A., a sus médicos responsables MVZ. Javier Rodríguez Pérez y MVZ. Julieta Islas Reyes por su colaboración y disposición de permitirnos la obtención del material biológico.

Se agradece el apoyo financiero y de infraestructura de los proyectos:

Fisiopatología de la Reproducción (FESC - PIAPI 1810, 2030), Evaluación de la melatonina como antioxidante en la crioconservación de semen de cerdo: efectos sobre la crio supervivencia espermática y la fertilización in vitro (PAPIIT IN220419, IN219620), Variación estacional de los niveles de melatonina en plasma seminal y su relación con la susceptibilidad de los espermatozoides de caprino a la crioconservación (PAPIIT IN205421), Estudio de la asociación entre la fibrosis periglandular con lesiones inflamatorias endometriales en vacas lecheras (PAPIIT IN219620).

ÍNDICE

• DEDICATORIAS.....	2
• AGRADECIMIENTOS	4
• ÍNDICE	5
○ Índice de Tablas	6
○ Índice de Figuras	7
• RESUMEN.....	8
• REVISIÓN DE LA LITERATURA	10
○ Maduración del ovocito	10
▪ Ovogénesis.....	10
▪ Foliculogénesis.....	13
▪ Ovulación.....	16
○ Hormonas relacionadas a la foliculogénesis y ovogénesis.....	16
▪ Clasificación.....	17
▪ Mecanismo de acción de las gonadotropinas	18
▪ Productos hormonales.....	19
○ Producción in vitro de embriones porcinos (PIV).....	21
▪ Maduración in vitro (MIV)	21
▪ Fertilización in vitro (FIV).....	22
▪ Desarrollo in vitro (DIV)	22
▪ Medios de Cultivo	22
▪ Evaluación de maduración in vitro de ovocitos	23
• ANTECEDENTES	24
• JUSTIFICACIÓN	25
• HIPÓTESIS	26
• OBJETIVOS	26
• MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
• ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	31
• RESULTADOS	31
• DISCUSIÓN.....	34
• CONCLUSIÓN.....	37
• PERSPECTIVAS.....	37
• BIBLIOGRAFÍA.....	38
• ANEXOS.....	45

Índice de Tablas

Tabla 1. Tiempo de desarrollo de las células germinales femeninas en la cerda.....	15
Tabla 2. Ejemplos de hormonas reproductivas.....	18
Tabla 3. Productos hormonales utilizados en el proceso experimental.....	30
Tabla 4. Resultados de la etapa 1 para maduración in vitro de ovocitos porcinos con fluido folicular.....	31
Tabla 5. Efecto de diferentes productos hormonales sobre la maduración de ovocitos de cerda.....	31
Tabla 6. Tiempo (horas) de producción de una corrida por día.....	33

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema de ovogénesis..	11
Figura 2. Campana de flujo laminar con el equipo y materiales necesarios para la aspiración folicular y búsqueda de ovocitos	28
Figura 3. Medio de maduración TCM 199 y colorante utilizado en la tinción de Azul brillante de cresilo (BCB).....	30
Figura 4. Gráfica 1. Efectos de cuatro tratamientos hormonales de diferentes marcas comerciales en la MIV de ovocitos de cerda..	32
Figura 5. Gráfica 2. Resultados por corrida (replica) de la tinción azul brillante de cresilo (BCB) expresado en porcentaje.....	32
Figura 6. Gráfica 3. Porcentaje de ovocitos evaluables y no evaluables por corrida	33

RESUMEN

La maduración *in vitro* de los ovocitos es una técnica importante dentro de la producción *in vitro* de embriones, con esta se pueden generar ovocitos capaces de ser fertilizados y posteriormente llevar a cabo el desarrollo de un embrión. Dado que la producción *in vitro* de embriones y ovocitos porcinos sigue siendo un proceso muy ineficiente se han realizado diversos estudios a lo largo de los años buscando elevar los porcentajes de maduración, ya que con un método eficaz de maduración se elevarán los porcentajes de obtención de ovocitos fertilizados.

Las hormonas son una parte importante para la maduración del ovocito *in vitro*, ya que *in vivo* las hormonas gonadotróficas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) son fundamentales en el ciclo estral para el crecimiento y desarrollo final del ovocito. Dentro de la Medicina Veterinaria las hormonas gonadotropina coriónica equina (eCG) y gonadotropina coriónica humana (hCG) son comúnmente utilizadas para el control del ciclo estral de diversas especies animales ya que tienen un mecanismo de acción similar a la LH y FSH. Ambas las podemos encontrar fácilmente de manera comercial solas o en combinación entre ellas.

En esta tesis se trabajó en la estandarización de la metodología para la maduración *in vitro* de ovocitos de cerda dentro del laboratorio 2 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES Cuautitlán, se recolectaron los ovarios en solución salina fisiológica a 34° – 35° C, se procesaron recolectando los ovocitos y sometidos a un proceso de selección con la tinción azul brillante de cresilo e incubándolos en medio TCM 199 suplementado con PVA 0.1%, glucosa 3.05mM, piruvato de sodio 0.91mM, gentamicina 10µg/ml, EGF a 10 ng/ml y cisteína 0.57 mM por 44 horas a 38.5°C, 5% de CO₂, 95% de aire y humedad a saturación con los tratamientos hormonales, éstos fueron de uso comercial entre los que se encuentran Chorulon® (hCG) a 10 UI/ml + Novormon® (eCG) a 10 UI/ml, Merional® (hMG) 26 µl/ml, PG600® (eCG y hCG) a 10 UI/ml y PG600® (eCG y hCG) a 10 UI/ml + Chorulon® (hCG) a 5 UI/ml.

Se obtuvieron diferencias significativas en la etapa de Meiosis I con respecto a los tratamientos 2 y 3 (Merional® y PG600® respectivamente); el Merional® obtuvo porcentajes mayores en esta etapa, sin embargo se obtuvieron bajos índices de maduración con respecto a la literatura en los diversos tratamientos. No hubo diferencias significativas entre los demás tratamientos en las distintas etapas, dejando así un antecedente para la metodología de próximos trabajos.

INTRODUCCIÓN

El cerdo doméstico no solo es una especie ganadera económicamente importante, ya que en México en estados como Jalisco, Sonora y Puebla representa el 48% de la producción ganadera (Instituto Nacional de Economía Social [INAES], 2018), sino también un modelo animal biomédico cada vez más reconocido debido a sus similitudes fisiológicas con los humanos, por lo cual existe un gran interés en los factores que afectan la producción eficiente de embriones (Montero *et al.*, 2015).

El manejo reproductivo en las cerdas juega un papel importante en el mantenimiento de la producción constante y controlada cuyo principal objetivo es obtener el mayor número de lechones destetados por animal, unidad de tiempo y al menor costo posible (Montero *et al.*, 2015). Mundialmente se requiere seguir mejorando la producción de cerdo ya que la demanda de carne y de insumos provenientes del cerdo ha ido en aumento. La diversidad genética es indispensable para que los ganaderos continúen con la mejora genética y adaptabilidad de la especie al medio (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2016).

La producción de embriones porcinos (y por ende la maduración) ha sido investigada desde hace 50 años, en comparación con otras especies, es un proceso muy ineficiente con bajas tasas de desarrollo embrionario, por lo tanto, es importante el desarrollo de técnicas en el laboratorio para la mejora de la eficiencia en la obtención de embriones porcinos (Herrick, 2019).

Los métodos de maduración de ovocitos, fertilización y cultivo juegan un papel extremadamente importante en la forma en que se desarrollarán el embrión, el feto y la descendencia (Herrick, 2019).

En este estudio se maduraron *in vitro* ovocitos porcinos en el Laboratorio 2 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, utilizando como medio de maduración TCM-199, suplementado con eCG, hCG, hMG, incubando el medio por 44 horas a 38.5°C, 5% de CO₂ y 95% de aire.

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Maduración del ovocito

De acuerdo con Sagata (1998), la maduración del ovocito implica una serie de procesos que tienen como finalidad la adquisición de la competencia del ovocito; es un proceso complejo que se realiza para distinguir a los ovocitos que son capaces de producir un embrión viable (Tarazona *et al.*, 2010).

El ovocito una vez alcanzado su tamaño final, puede considerarse como adulto y está preparado para su maduración. La ruptura de la vesícula germinal es seguida por la formación de un huso mitótico que emigra al polo germinal, y en un periodo de tiempo más o menos largo acontecen las dos divisiones meióticas. La primera reduce los cromosomas a un número haploide (n). La segunda, en cambio, es una mitosis del tipo habitual en lo que respecta a los cromosomas; pero la división del citoplasma es extremadamente inequitativa, y en consecuencia se forman dos diminutos cuerpos polares que son rechazados al polo animal (Brachet *et al.*, 1976).

Ovogénesis

La ovogénesis es la formación y maduración del gameto de las hembras que se inicia en la etapa embrionaria, se detiene y continúa al llegar a la pubertad; es un proceso en el cual ocurren divisiones mitótica y meiótica para llegar a producir un gameto funcional. En porcinos, este proceso comienza alrededor del día 18 a 20 de gestación, en donde las células germinales primordiales se dividen por mitosis en la cresta genital y a partir de aquí se forman las ovogonias (Pineda y Dooley, 2003; Hafez y Hafez, 2002; Jiménez y Merchant, 2003; Krisher, 2013). Una vez que las ovogonias llegan a la fase final de la interfase y se sintetiza el DNA, inicia la profase meiótica (día 47 de la gestación) y se le considera como ovocito primario. Cuando el animal nace sigue el crecimiento del ovocito primario y se detiene en diploteno de la profase I de la meiosis I (Figura 1).

En la primera división el número cromosómico es mantenido diploide ($2n$) y posteriormente se reducirá con procesos de división meiótica a la mitad y así producir gametos haploides (Hafez y Hafez, 2002; Jiménez y Merchant, 2003; Avalos, 2014). A medida que el ovocito va madurando, se inician cambios tanto nucleares como citoplasmáticos que se explicarán más adelante.

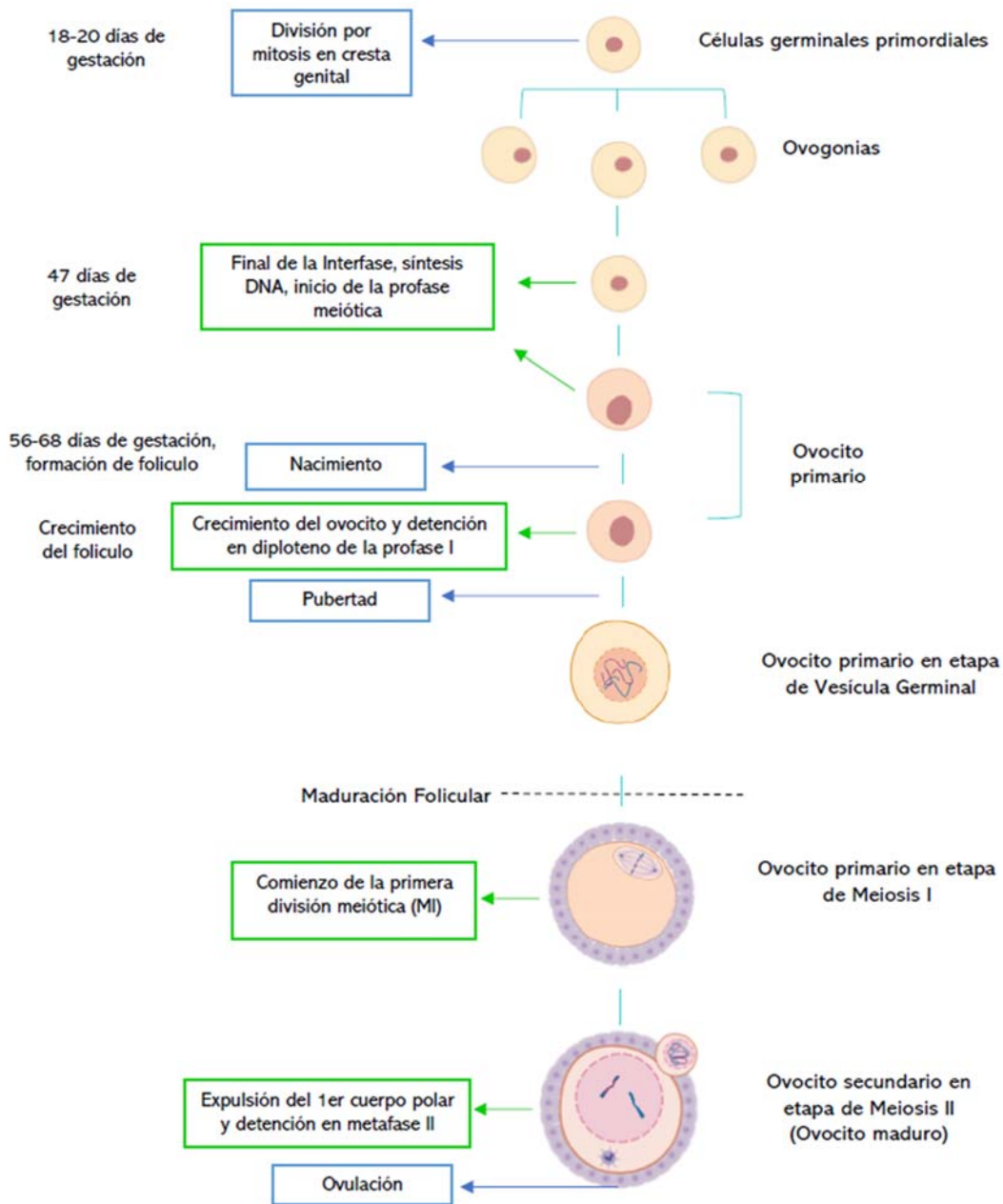


Figura 1. Esquema de ovogénesis. Modificado de Hafez y Hafez (2002), Jiménez y Merchant (2003) y Krisher (2013).

Maduración nuclear

Al iniciar la pubertad, por acción de la LH y FSH (oleada de gonadotropinas), los ovocitos primarios con núcleo en forma de vesícula germinal reactivan la meiosis I e inicia la primera división meiótica; al proceso de salir de la fase G2 (crecimiento) y completar la meiosis se le denomina competencia meiótica (Hunter, 2000; Hafez y Hafez, 2002; Tarazona *et al.*, 2010).

La reactivación de maduración de los ovocitos requiere de la activación de un complejo proteínico heterodimérico conocido como factor promotor de la fase M o mitosis (FPM o MPF) que es una proteína quinasa de serina y treonina involucrada en la regulación del ciclo celular (Hunter, 2000; Jiménez y Merchant, 2003). Esta activación detona una serie de reacciones dando como resultado la ruptura de la membrana nuclear, condensación de los cromosomas y formación del huso (ruptura de la vesícula germinal y progreso hasta metafase I), (Hunter, 2000; Tarazona *et al.*, 2010).

Al final de la primera división meiótica, la actividad del FPM decae, pero no hay cambios reversibles en la estructura nuclear ni reorganización de los organelos, por lo que se sugiere la participación de otra cinasa diferente para este suceso como las cinasas activadas por mitógenos (MAP-cinasas), las cuales se han encontrado en la maduración de los ovocitos porcinos (Inoue *et al.*, 1995) y son capaces de fosforilar a sustratos semejantes a los del FPM y evitan que el ovocito entre en una interfase entre las meiosis I y II (Hunter, 2000, Jiménez y Merchant, 2003).

Ya que concluye la meiosis I y la anafase I, se continúa el proceso a metafase II de la meiosis II para alcanzar el estado haploide una vez que se expulsa el primer cuerpo polar. Cuando el ovocito se detiene en metafase II, se considera maduro y está listo para la fecundación. Una vez que ocurre la fecundación se libera el segundo cuerpo polar (Figura 1). Todos los eventos anteriormente mencionados son vitales para mantener una fertilización exitosa y el desarrollo embrionario temprano (Hunter, 2000; Jiménez y Merchant, 2003; Tarazona *et al.*, 2010).

Maduración citoplasmática

La maduración citoplasmática describe los cambios ultraestructurales como síntesis de diversas proteínas necesarias para el desarrollo, redistribución de organelos tales como mitocondrias, gránulos corticales, aparato de Golgi y retículo endoplásmico, que tienen lugar en el ovocito desde la vesícula germinal hasta la etapa de Metafase II (MII) y la posesión de la competencia de desarrollo del ovocito (Sun, 2003; Ahmed *et al.*, 2019). En los ovocitos inmaduros los gránulos corticales (GC) presentan una distribución uniforme y homogénea en todo el citoplasma, a diferencia de lo observado en ovocitos madurados *in vitro*, los cuales presentan una distribución periférica. Por ende, los cambios en la distribución y localización de los GC durante la maduración

podrían ser utilizados como un importante indicador de la maduración citoplasmática (Luna Fernández, 2011).

La maduración citoplasmática engloba los siguientes procesos: acumulación de proteínas y mARN; desarrollo de mecanismos reguladores de calcio; cambios en la actividad en el factor promotor de la maduración (MPF) y proteína cinasa mitogénica activada (MAPK); y reorganización de organelos celulares (García, 2014).

Otros parámetros morfológicos indirectos considerados para evaluar la maduración citoplasmática incluyen la expansión de las células del cúmulo, la expulsión del cuerpo polar y el aumento del espacio perivitelino (Ahmed *et al.*, 2019).

Foliculogénesis

Se define como la formación de un folículo maduro o de Graaf a partir de un grupo de folículos primordiales, el cual es un proceso altamente dinámico y rápido que ocurre durante la fase folicular del ciclo estral de la hembra, el cual ocurre simultáneamente a la ovogénesis (Pineda y Dooley, 2003). El ovario de la cerda tiene una gran cantidad de células germinales, todas con un gran potencial para convertirse en un folículo ovulatorio (Pitzel *et al.*, 2000).

La foliculogénesis es controlada por diversos factores de crecimiento producidos internamente por el ovocito, como el Factor de Crecimiento de Diferenciación 9 (GDF9) y la Proteína Morfogénica Ósea 15 (BMP15) (Salas, 2014), y externamente por la acción hormonal de la FSH (Hormona Folículo Estimulante) (Hafez y Hafez, 2002).

Los ovocitos se rodean de una capa de células planas, las cuales emiten proyecciones citoplasmáticas hacia éste y establecen uniones comunicantes (GAP), constituyendo así un folículo primordial, el cual permanece inactivo hasta la pubertad (Salas, 2014; Jiménez y Merchant, 2003); en esta etapa de la foliculogénesis los folículos primordiales unilaminares carecen de irrigación. En porcinos, los primeros folículos se forman a partir del día 56 a 68 de gestación y se empiezan a desarrollar a los 75 a 90 días de la gestación (Krisher, 2013). Tabla 1.

El número de folículos primordiales que se someten a la foliculogénesis para alcanzar la etapa madura (folículo de Graaf) es solo una pequeña fracción del número total de

folículos existentes (Pineda y Dooley, 2003); al comienzo de cada ciclo, varios de los folículos que no sufren atresia crecen y forman una cavidad alrededor del ovocito, esta cavidad está llena de líquido folicular. El proceso de atresia incluye apoptosis. No se sabe cómo se elige un folículo para ser el dominante en esta fase folicular, pero aparentemente se relaciona con la capacidad del folículo para secretar el estrógeno necesario para la maduración final. Las células de la teca interna del folículo son la principal fuente de estrógenos circulantes; no obstante, el líquido folicular tiene un alto contenido de estrógeno y gran parte del mismo proviene de las células de la granulosa (Barrett *et al.*, 2013). La producción de estradiol determina cual folículo adquirirá los receptores de LH necesarios para la ovulación (Hafez y Hafez, 2002).

Las células de la granulosa forman una barrera de difusión entre la sangre y el ovocito, de manera que el folículo ovárico proporciona al ovocito un medio apropiado para su alimentación y maduración; esto incluye el mantenimiento de una temperatura intrafolicular, en particular en la etapa preovulatoria (Pineda y Dooley, 2003). En un inicio, las células de la granulosa son planas, posteriormente se transforman a células cuboidales y conforme el folículo va creciendo junto con el ovocito, éstas aumentan en número y forman varias capas de células; al final del periodo de crecimiento, el ovocito se detiene y se encuentra rodeado de células foliculares conocidas como células del cúmulo y formando el complejo ovocitos-células del cúmulo (COC's) (Hafez y Hafez, 2002; Jiménez y Merchant, 2003; Krisher, 2013).

A medida que crece el folículo, una capa glucoproteica compleja, que formará la zona pelúcida, se deposita entre la membrana celular y la capa interna de las células de la granulosa. Los procesos de las células de la granulosa y de la membrana plasmática del ovocito mantienen el contacto entre la granulosa y el ovocito. El contacto entre el ovocito y las células de la granulosa pueden evitar la maduración del ovocito, mediante algún factor peptídico, llamado inhibidor de maduración del ovocito (OMI), producido por las células de la granulosa el cual mantiene al ovocito en la etapa de diacinesis de la meiosis. Hasta donde se sabe actualmente, el OMI está ausente en el fluido folicular de folículos ovulatorios ya que el efecto de la LH presumiblemente bloquea la transferencia de OMI, lo cual permite que la meiosis se reinicie en el momento de la ovulación (Pineda y Dooley, 2003).

Tabla 1. Tiempo de desarrollo de las células germinales femeninas en la cerda. Modificado de Krisher (2013).

Evento	Día de gestación
Llegada de células germinales a la gónada	18
Quistes de células germinales/Cordones ovígeros	20-50
Inicio meiótico	47
Formación del folículo	56-68
Desarrollo folicular (primera oleada)	75-90
Gestación completa	112-114

Desarrollo Folicular

El proceso del desarrollo folicular en la cerda, se puede dividir en dos fases: El reclutamiento inicial, que se refiere a la activación de grupos de folículos pequeños y medianos (primordiales) presentes en la superficie del ovario que pueden ser relacionados como folículos ovulatorios; la siguiente fase es la selección, que se refiere a los pocos folículos que se desarrollan completamente y ovulan, la mayoría de los folículos se atresian antes de la ovulación (Fernández Reyes *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2010; Krisher, 2013).

Los folículos en crecimiento (folículo secundario o preantral) son folículos que han abandonado la etapa de reposo como folículos primordiales y que han comenzado a crecer, se caracterizan por desarrollar dos o más capas de células de la granulosa que rodean al ovocito (Pineda y Dooley, 2003). Este folículo es dependiente de gonadotropinas.

El folículo terciario (folículo antral o folículo vesicular) se caracteriza por la presencia del antro folicular; las células de la granulosa se agrupan periféricamente en la parte interior de los folículos. Los folículos de Graaf son folículos en los cuales el antro es claramente visible; las células del tejido conectivo circundante se diferencian como teca interna y teca externa (Pineda y Dooley, 2003).

Al inicio del ciclo estral hay aproximadamente 50 folículos pequeños (de 2 a 5 mm de diámetro), de los cuales, de 10 a 25 se encuentran en fase folicular (Pitzel *et al.*, 2000).

Ovulación

Es la liberación de ovocitos a través de la superficie del ovario mediante la ruptura de los tejidos que le rodean. Se da una vez que el folículo alcanza el tamaño ovulatorio ideal y se desencadena por un aumento súbito de gonadotropinas (principalmente LH) inducido por estrógenos, generalmente se presenta 24 horas previas a la ovulación (Krisher, 2013).

En las hembras porcinas, los folículos preovulatorios alcanzan un tamaño entre 8 y 12 mm; los folículos destinados a ovular reciben un mayor volumen de sangre (Pitzel *et al.*, 2000).

El pico de LH permite el inicio del proceso de luteinización en las células de la granulosa que modifica la secreción celular de estrógenos a progesterona, también provoca la secreción de relaxina y la prostaglandina F2 alfa que alteran la continuidad del tejido conjuntivo de las capas tecales del folículo (Krisher, 2013).

La ruptura del folículo se debe a la desintegración del tejido conjuntivo por enzimas hidrolíticas dentro de vesículas en los fibrocitos que alteran la teca junto con la prostaglandina F2 alfa y la relaxina (Krisher, 2013).

Conforme el folículo se prepara para la ovulación, simultáneamente se van desarrollando una serie de cambios en el ovocito, entre los que destacan la pérdida de la cohesividad de las células del cúmulo, la maduración citoplasmática y nuclear, todo esto con la finalidad de liberar un ovocito maduro listo para la fecundación.

Hormonas relacionadas a la foliculogénesis y ovogénesis

Las hormonas son productos químicos sintetizados por tejidos específicos y transportados por el sistema vascular para actuar sobre otros tejidos a bajas concentraciones (Klein, 2014).

Los eventos reproductivos en mamíferos son controlados a través de la síntesis de estrógenos, andrógenos, progesterona, prolactina, oxitocina y específicamente las relacionadas a la foliculogénesis y ovogénesis, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), las cuales provienen de la adenohipófisis bajo el

control de una hormona hipotalámica, hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Lozano Duran, 2018; Klein, 2014).

La pubertad en las cerdas se presenta cuando el hipotálamo pierde sensibilidad a la retroalimentación negativa de los esteroides ováricos y una maduración que le permite a la cerda manifestar conductas de celo. Estos eventos se inician alrededor de los 110 días de edad, dependiendo de la raza y pureza racial de las cerdas (Lozano Duran, 2018).

Clasificación

Existen diversas clasificaciones para las hormonas ya sea por su estructura química, su mecanismo de acción, la distancia entre el emisor y el receptor o el tipo de células que las secretan (Hafez y Hafez, 2002; Klein, 2014).

La clasificación más utilizada es por estructura química, y con base en ésta las hormonas se pueden dividir en cinco grupos (Hafez y Hafez, 2002; Klein, 2014):

1. Proteicas o polipeptídicas: Formadas por cadenas largas de péptidos y pueden estar en combinación con azúcares (glicoproteínas).
2. Peptídicas: Formadas por cadenas de aminoácidos.
3. Esteroideas: Derivadas del colesterol.
4. Ácidos grasos: Derivados del ácido araquidónico.
5. Aminas o derivadas de aminoácidos: Derivadas de triptófano o tirosina.

Tabla 2. Ejemplos de hormonas reproductivas. Modificado de Hafez y Hafez (2003) y Matamoros (2017).

Hormona	Estructura Química	Secretada por	Acción principal
Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)	Decapéptido	Hipotálamo	Liberación de LH y FSH.
Hormona foliculo estimulante (FSH)	Glucoproteína	Hipófisis anterior	Hembra: Estimula crecimiento folicular. Macho: Estimula espermatogénesis.
Hormona Luteinizante (LH)	Glucoproteína	Hipófisis anterior	Hembra: Estimula ovulación y luteinización de folículos ováricos. Macho: Secreción de testosterona.
Prolactina (PRL)	Polipéptido	Hipófisis anterior	Promueve lactancia y conducta materna
Lactógeno Placentario (LP)	Proteína	Tejido placentario	Regulación de los nutrientes maternos hacia el feto. Acción de hormona de crecimiento.
Estrógeno	Esteroides 18 carbonos	Teca interna del folículo ovárico	Promueve comportamiento sexual; estimula el desarrollo de características sexuales secundarias
Prostaglandina F2 alfa	Ácido graso insaturado de 20 carbonos	Tejidos corporales	Provoca contracciones en músculo liso en aparatos gastrointestinal y reproductor. Acción luteotrófica.
Melatonina	Derivada del Triptófano	Glándula pineal	Control en el ciclo circadiano de luz-obscuridad. Inducción del ciclo ovárico de la oveja e inhibición del ciclo en yegua

Mecanismo de acción de las gonadotropinas

La acción de una hormona requiere de la unión de ésta a un receptor de la célula blanco; esto permite que la hormona sea distinguida de las demás sustancias y activar una respuesta celular (Belfiore y LeRoith, 2018).

Las hormonas pueden ingresar a la célula según la localización del receptor en la célula blanco, ya sea en la superficie celular (receptores de membrana) o intracelulares a nivel del núcleo (receptores nucleares). La mayoría de las hormonas peptídicas se unen a los receptores de membrana, mientras que las derivadas de aminoácidos y las esteroides usan los receptores nucleares (Belfiore y LeRoith, 2018).

Las hormonas gonadotróficas luteinizante (LH) y foliculoestimulante (FSH) son fundamentales en el eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal, el cual controla el ciclo estral. Estas hormonas son sintetizadas y secretadas por las células gonadotropas adenohipofisarias luego de ser estimuladas por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), durante todo el ciclo estral la secreción de gonadotropinas es pulsátil, los pulsos de LH son de mayor frecuencia en la fase folicular, para posteriormente disminuir en la fase lútea. La secreción de FSH ocurre durante la fase lútea del ciclo, alcanzando una meseta en la fase folicular, previo al pico de LH preovulatorio. Estas variaciones ocurren debido al efecto estimulador

(retroalimentación positiva) e inhibidor (retroalimentación negativa) que ejercen las hormonas esteroideas ováricas, estrógenos y progesterona, sobre el eje hipotálamo-hipofisario. La acción de las hormonas esteroideas sobre el hipotálamo determina dos tipos de secreción de gonadotropinas: “tónica”, manteniendo niveles basales, y “cíclica”, produciendo un aumento significativo en los niveles de LH y FSH, según la fase del ciclo (Adams *et al.*, 2008).

Al comienzo de la fase folicular, los folículos inmaduros secretan bajas cantidades de estrógenos que inducen un efecto de retroalimentación negativa en el hipotálamo e hipófisis, provocando la secreción tónica de FSH y LH. Cuando uno de los folículos alcanza la fase preovulatoria, el aumento sostenido de los niveles circulantes de estrógenos estimula el centro cíclico del hipotálamo (retroalimentación positiva) produciéndose el pico preovulatoria de LH. Este pico desencadena la maduración final del folículo, la ovulación y la luteinización de la estructura folicular y la consecuente formación del cuerpo lúteo (Hafez, 1987).

Las células de la teca interna poseen numerosos receptores para LH, la cual actúa mediante el cAMP para aumentar la conversión del colesterol en androstenediona; las células de la granulosa tienen receptores para FSH, la cual facilita su secreción de estradiol mediante el cAMP para aumentar su actividad de aromatasa (Barrett *et al.*, 2013).

Productos hormonales

La gonadotropina coriónica equina (eCG), también conocida como gonadotropina sérica de yegua gestante (PMSG), es una hormona placentaria glicoproteica sintetizada y secretada por células trofoblásticas equinas entre los 40 y 130 días de gestación (Chopineau *et al.*, 1993). La eCG se encuentra circulando en sangre de yeguas gestantes y no se excreta por orina (Hafez y Hafez, 2002).

En diversos estudios se ha demostrado que la eCG tiene actividades biológicas similares a la FSH y LH, ya que sus subunidades alfa y beta son parecidas a las de estas hormonas y por lo tanto tiene afinidad para unirse a los mismos receptores, generando respuestas similares, siendo dominantes las acciones de FSH (Chopineau *et al.*, 1993; Hafez y Hafez, 2002; Whittemore y Kyriazakis, 2008).

La eCG fue una de las primeras gonadotropinas disponibles comercialmente y se utiliza generalmente para sincronización de celo en hembras jóvenes y superovulación en animales domésticos (mayormente en bovinos), ya que estimula el desarrollo de folículos ováricos (Chopineau *et al.*, 1993; Hafez y Hafez, 2002; Whittemore y Kyriazakis, 2008).

Productos hormonales que contienen eCG: Novormon 5000® (Virbac, 2019), Folligon® (MSD Salud Animal, 2020), GonActive® eCG (Virbac, 2020), ECEGON® (Biogénesis Bagó, 2020), Sincro eCG (Ourofino, 2020). En combinación con hCG se dispone de: PG600® (MSD Salud Animal, 2020), Fertipig® (Ceva, 2020), Duogestál (Zoetis, 2020).

La hormona Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) al igual que la hormona luteinizante (LH) son hormonas glicoproteicas heterodiméricas, su subunidad alfa es similar a la de la LH humana, porcina, ovina y bovina; por esto son consideradas biológicamente equivalentes (Hafez y Hafez, 2002; Bildik *et al.*, 2020).

La síntesis de hCG empieza en etapas muy tempranas de la gestación; es producida por el sincitiotrofoblasto desde el día 6 o 7 después de la fecundación y después de la implantación; se puede detectar tanto en sangre como en orina (Merz, 1996; Barrett *et al.*, 2013).

La hCG se utiliza en la fertilización *in vitro* ya que promueve la supervivencia y la actividad esteroidogénica del cuerpo lúteo al actuar a través de los receptores LH expresados en las células de la teca y la granulosa del ovocito (Bildik *et al.*, 2020).

Los productos hormonales que contienen hCG son: Chorulon® (MSD Salud Animal, 2020), Gonadotropina Coriónica (Loeffler, 2020), Gonaforte® (Parfarm, 2020), Choriomon® (IBSA, 2020), Pregnyl® (Schering-Plough, 2020), Ovidrel® (Merck Serono, 2020).

La gonadotropina menopáusica, postmenopáusica humana o menotropina (hMG), es una hormona obtenida de la orina de mujeres que cursan la menopausia. Al finalizar la edad reproductiva en la mujer, los ovarios dejan de responder a las gonadotropinas y su función desciende de manera paulatina hasta que desaparecen los ciclos sexuales (menopausia). Esta falta de respuesta se acompaña de una reducción en el número de folículos primordiales, por lo que los ovarios ya no secretan suficiente

progesterona ni estradiol 17 β y generan una pequeña cantidad de estrógenos gracias a la aromatización de la androstenediona en los tejidos periféricos. Conforme disminuye la retroalimentación negativa de los estrógenos y la progesterona, la secreción de hormona folículo estimulante aumenta y su concentración plasmática se eleva de manera considerable, mientras la concentración de hormona luteinizante permanece moderadamente alta (Barrett *et al.*, 2013).

Los productos hormonales que contienen hMG son: Merional® (IBSA, 2020), HMG Massone® (Ferring Pharmaceuticals, 2020), Merapur® (Ferring Pharmaceuticals, 2020).

Producción in vitro de embriones porcinos (PIV)

Las tecnologías de reproducción asistida en el cerdo son críticas para la producción de cerdos genéticamente modificados como modelos de enfermedades humanas y para mejorar la producción agrícola. Siendo los métodos de maduración de ovocitos, fertilización y cultivo, muy importantes para un buen desarrollo embrionario.

La PIV de embriones incluye tres pasos principales consecutivos: la maduración *in vitro* de ovocitos inmaduros (MIV), la fertilización *in vitro* de ovocitos madurados (FIV) y el cultivo o desarrollo *in vitro* de embriones (CIV o DIV).

Maduración in vitro (MIV)

El proceso de maduración *in vitro*, lleva una serie de procedimientos muy estrictos y específicos de acuerdo a la especie en cuestión, para lo cual se debe cuidar ciertos estándares en el manejo de materiales, reactivos, medios de cultivo y tiempos. Debido a esto es necesario programar las actividades a realizar, a fin de contar con todo lo necesario en tiempo y forma para mantener la viabilidad de las células. La MIV consiste en obtener ovocitos inmaduros en estadio de vesícula germinal, para posteriormente ser madurados bajo condiciones de laboratorio (Redel *et al.*, 2019).

Con el fin de incrementar la eficiencia en la MIV y FIV, así como en 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) (Ducolomb *et al.*, 2005).

Fertilización in vitro (FIV)

La FIV permite que una muestra de ovocitos y espermatozoides puedan interactuar en condiciones de laboratorio para la producción de embriones que puedan ser transferidos al útero. Cuando la fusión de ambos gametos se genera, se forma un cigoto el cual puede desarrollar un nuevo organismo (Avalos, 2014).

La técnica de FIV se ha logrado realizar con altos porcentajes de éxito en diferentes especies de mamíferos; Abeydeera *et al.* (2000) reportan porcentajes de fertilización de un 81% en la especie porcina.

Desarrollo in vitro (DIV)

En la última década se han formulado diferentes medios que permiten el desarrollo embrionario *in vitro* desde el estadio de una a 2 células hasta el estadio de blastocisto, tanto en embriones producidos *in vivo* como en embriones producidos a partir de ovocitos madurados y fertilizados *in vitro* (García, 2014).

Medios de Cultivo

Los sistemas de desarrollo embrionario han buscado métodos para la mejora del desarrollo embrionario *in vitro*, así han evolucionado desde soluciones básicas hasta la formulación de soluciones complejas muy semejantes al medio en el que el embrión se desarrolla en el aparato reproductor (Dunogent *et al.*, 2005). De igual forma para incrementar la eficiencia y reproducibilidad en la MIV, se han creado medios definidos, en los cuales se añade el alcohol polivinílico (PVA) y suplementos como cisteína, glucosa, piruvato de sodio, factor epidérmico (EGF), LH y FSH (Yoshioka *et al.*, 2003).

Medios secuenciales

Para optimizar las condiciones en que se realiza el desarrollo embrionario, se han formulado medios secuenciales los cuales imitan el cambio en el entorno materno que experimenta el embrión durante el desarrollo *in vivo* (Lane *et al.*, 2003).

Medios Continuos

Recientemente se han ido desarrollando los medios continuos (one-step), basados en la filosofía de darle todos los nutrientes al embrión y que éste seleccione cuál incorporar. El uso de estos medios continuos permite cultivar los ovocitos sin necesidad de cambiar de medio durante el proceso de maduración *in vitro* (Dunogent *et al.*, 2005).

Evaluación de maduración in vitro de ovocitos

Tinción Aceto orceína

La orceína es un colorante el cual su mecanismo de tinción no se entiende claramente, ya que se conforma de una variedad de fenazonas, que permiten interactuar a un pH ácido con grupos cargados negativamente o posiblemente interactuar hidrofóbicamente con cromatina. La fijación de ácido acético se lleva a cabo en los cromosomas (Tonzetich, 2004).

Tinción Azul Brillante de Cresilo (BCB)

Para una selección homogénea, así como la competencia del desarrollo de los ovocitos para la producción *in vitro*, se ha usado la tinción BCB (Egerszegi *et al.*, 2010), ya que es una tinción vital usada para la selección de ovocitos previo a la maduración, en función de la actividad de la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, ya que ésta reduce el cresilo volviéndolo incoloro. En particular esta enzima cataliza la primera reacción de la vía de las pentosas fosfato y es la reacción limitante de esta, es decir la funcionalidad de la vía depende de esta enzima. En los ovocitos esta vía de las pentosas fosfato está activa cuando hay procesos de biosíntesis y crecimiento celular, deprimiendo su actividad cuando el ovocito termina su fase de crecimiento. Así los ovocitos que mantienen su citoplasma azul tras ser cultivados con BCB son aquellos que terminaron su fase de crecimiento y están aptos para seguir la maduración (Carrasco, 2012). Esta técnica ha sido usada en diferentes especies como ratones, cerdos, cabras prepúberes, búfalas y vacas (Egerszegi *et al.*, 2010). En diversos estudios se ha observado que los porcentajes de ovocitos que alcanzaron MII en los grupos BCB positivos, en el momento de la recolección de ovocitos, aumentaron en comparación con los del grupo BCB negativos y control (Wongsrikeao *et al.*, 2006). Sin embargo, es importante mencionar que esta técnica para ser efectiva debe ser realizada una sola vez durante el procedimiento de PIV ya que se ha comprobado que con una doble aplicación de la técnica BCB puede

conducir a una fertilización y desarrollo embrionario deficiente o incluso tener un efecto tóxico en los ovocitos porcinos (Kempisty *et al.*, 2011).

ANTECEDENTES

Los cerdos representan un modelo apropiado para la creación de animales transgénicos, con el fin de elaborar productos biológicos y obtener órganos para xenotrasplantes, debido a que presentan aspectos fisiológicos, anatómicos y bioquímicos similares a los de los seres humanos.

El inicio de la técnica de producción *in vitro* de embriones (PIV), se remonta a los años 50, cuando se obtuvieron los primeros conejos por fertilización *in vitro*, aunque fue hasta 1982 cuando se logró obtener la primera ternera por esta técnica (Ducolomb *et al.*, 2005). No obstante que la primera producción *in vitro* exitosa fue reportada en 1986, aún hay una tasa de éxito relativamente baja (Fowler *et al.*, 2018).

Abeydeera *et al.* (2000) examinaron la capacidad del Factor de Crecimiento Epidermal a una concentración de 10 ng/ml, para mejorar el desarrollo de ovocitos porcinos madurados por MIV. Se obtuvo una mayor cantidad significativa de ovocitos madurados en los medios que contenían EGF en comparación con los medios que no lo contenían.

El proceso de MIV comienza con la aspiración de los complejos ovocito-células del cúmulo (COCs) de folículos ováricos de cerdas sacrificadas. Los COCs son madurados en medio TCM-199 suplementado (MIV) y se incuban durante 44 h. Todas las incubaciones se realizaron a 38.5°C, con 5% de CO₂, 95% aire y humedad a saturación (García, 2014).

Aunque se ha progresado en el campo de la producción *in vitro*, hay pocos informes de nacimientos de cerdos producidos por MIV y FIV, en los que se describe la transferencia de embriones. En México en el año 2005 se obtuvieron los primeros lechones producidos por estas técnicas (Ducolomb *et al.*, 2005).

JUSTIFICACIÓN

En el presente trabajo de tesis se implementó el uso de diferentes hormonas comerciales en el medio de maduración previo a la incubación de ovocitos porcinos, con la finalidad de diversificar las posibilidades de maduración de ovocitos y por ende, la producción *in vitro* de embriones porcinos, pudiendo así aumentar la descendencia de las cerdas que presenten alto valor genético, aportar ovocitos maduros y embriones para la investigación o implementar estas nuevas biotecnologías para reproducir especies en peligro de extinción.

HIPÓTESIS

Al suplementar el medio de maduración con productos hormonales comerciales, se incrementará el porcentaje de maduración de los ovocitos producidos *in vitro*.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la MIV de ovocitos porcinos utilizando cuatro productos hormonales comerciales para comprobar su efectividad *in vitro* y así obtener una opción accesible en la adquisición de las hormonas.

Objetivos particulares:

- Desarrollar y estandarizar el protocolo de maduración *in vitro* en ovocitos porcinos, dentro del laboratorio 2 de la UIM para futuros estudios de fertilización *in vitro*.
- Evaluar la eficiencia del FFP en la MIV para comparar su efecto con el del EFG en medio TCM-199.
- Identificar los ovocitos activos metabólicamente mediante la tinción de BCB como criterio de selección adicional a la morfología.
- Clasificar las etapas de maduración de los ovocitos mediante la identificación de las estructuras nucleares con la tinción de aceto orceína.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el laboratorio 2 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, ubicada en Km 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

Material biológico

Los ovarios se obtuvieron de hembras prepúberes en el rastro TIF 194 ubicado en San Lorenzo, Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Posteriormente fueron transportados en SSF al 0.9% con una temperatura de 34-35°C. Una vez en el laboratorio, los ovarios se lavaron con SSF al 0.9% a 35°C para eliminar restos de sangre y suciedad. Los ovarios se comenzaron a trabajar de 20 a 30 min después del sacrificio y la recolección de éstos.

Recuperación de ovocitos

La recuperación de ovocitos se realizó por medio de la técnica de aspiración folicular con aguja calibre 18G (rosa) y jeringa de 10 ml, puncionando los folículos de entre 3-6 mm de diámetro.

El fluido folicular aspirado se depositó en un tubo cónico de centrifuga (tipo falcon) de 15 ml y se dejó sedimentar por 20 minutos. Al concluir el tiempo de sedimentación se retiró el sobrenadante y se le adicionó medio de manipulación (TL-HEPES-PVA) a 37°C con un pH de entre 7.3 y 7.4 (Teteltitla, 2014) y una osmolaridad de entre 280 a 320 mosm/Kg; el proceso de sedimentación se realizó dos veces más con una duración de 15 min. Finalmente el paquete celular fue recuperado y depositado en una caja de Petri, agregando medio de manipulación para proceder a realizar la búsqueda de complejos ovocitos-células del cúmulo (COC's). Durante todo el proceso se controló la temperatura del medio en el que se mantuvieron tanto los ovarios y ovocitos, mediante una platina térmica, para disminuir la pérdida de viabilidad (Figura 2).

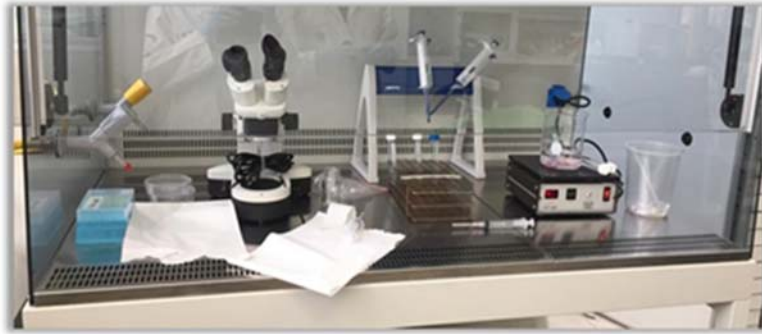


Figura 2. Campana de flujo laminar con el equipo y materiales necesarios para la aspiración folicular y búsqueda de ovocitos.

Búsqueda y selección de complejos ovocitos-células del cúmulo (COC's)

Usando microscopio estereoscópico marca National y con ayuda de micropipetas marca Eppendorf de varios volúmenes, se procedió a la búsqueda de COC's, seleccionando aquellos que tuviesen citoplasma homogéneo y con varias capas de células del cúmulo; posteriormente se realizaron 3 lavados depositando los COC's en una caja de petri de 50 mm con una gota de 500 μ L de medio de manipulación con la finalidad de eliminar detritus celulares.

Selección por viabilidad mediante actividad metabólica con Azul Brillante de Cresilo (BCB)

Después de la búsqueda se realizó una tinción para valorar la viabilidad mediante la actividad metabólica de los ovocitos; éstos se incubaron por 60 minutos en una solución de 26 μ M de BCB en medio TL-HEPES-PVA (Carrasco, 2012), al finalizar el tiempo se evaluaron visualmente con un microscopio estereoscópico contabilizando viables (con coloración azul o BCB+) y los no viables (sin coloración o BCB-) (Egerszegi *et al.*, 2010). Los ovocitos viables continuaron con el proceso de maduración. Esta selección solo se utilizó en la etapa 2 del proceso experimental.

Maduración *in vitro* de ovocitos porcinos

Una vez seleccionados los ovocitos, se realizaron tres lavados con medio de maduración en cajas de petri (Nunc®) con una gota de 500 μ l en cada uno. Se dividieron equitativamente en una caja de 4 pozos con 500 μ l de medio de maduración en cada uno, colocando como máximo 50 ovocitos por pozo; se agregaron las

hormonas (tratamientos hormonales) y se incubaron por 44 horas a 38.5°C, 5% de CO₂, 95% de aire y humedad a saturación (Ducolomb, 2004).

Proceso experimental

El trabajo experimental se dividió en dos etapas, ambas siguiendo la misma técnica para MIV en ovocitos porcinos, descrita por Abeydeera *et al.* (1998).

Etapas 1. Maduración con fluido folicular porcino y 2 tratamientos hormonales

Esta primera etapa se realizó con la finalidad de practicar y estandarizar la técnica de maduración *in vitro*, usando el fluido folicular porcino como alternativa al factor de crecimiento epidermal (Wang *et al.*, 1997).

El medio TCM-199 modificado se suplementó con fluido folicular porcino (FFP) al 10% (Wang *et al.*, 1997; Abeydeera *et al.*, 1998; Romero-Aguirregomez-corta *et al.*, 2014) en lugar del factor de crecimiento epidermal; una vez que los COC's estaban en la caja de cuatro pozos para cultivo, se les agregaron los tratamientos hormonales (Ducolomb, 2004; Fernández Reyes *et al.*, 2010; Fowler *et al.*, 2018):

Tratamiento 1 - PG600 a 10 UI/ml.

Tratamiento 2 - Merional A 26 µl/ml.

Etapas 2. Maduración con 4 diferentes tratamientos hormonales

En esta segunda etapa se utilizaron productos hormonales comerciales (Tabla 3) con la finalidad de obtener una alternativa más accesible al uso de hormonas específicas utilizadas para la maduración *in vitro*.

El medio TCM-199 modificado se suplementó con Factor de Crecimiento Epidermal a 10 ng/ml. Los tratamientos hormonales fueron:

Tratamiento 1 - Chorulon a 10 UI/ml + Novormon a 10 UI/ml (Abeydeera *et al.*, 1998; Andrés, 2001; Kidson *et al.*, 2003).

Tratamiento 2 - Merional 26 µl/ml (Ducolomb, 2004; Fernández Reyes *et al.*, 2010).

Tratamiento 3 - PG600 a 10 UI/ml (Fowler *et al.*, 2018).

Tratamiento 4 - PG600 a 10 UI/ml + Chorulon a 5 UI/ml (Cortés, 2011).

Tabla 3. Productos hormonales utilizados en el proceso experimental.

Producto Comercial	Principio Activo	Laboratorio
P.G. 600® (*)	eCG y hCG	Intervet International B.V.
Merional® (*)	hMG	IBSA Institut Biochimique SA
Novormon®5000	eCG	Virbac
Chorulon®	hCG	Intervet International B.V.

Los productos marcados con (*) se utilizaron en las dos etapas del proceso.



Figura 3. Medio de maduración TCM 199 (izquierda) y colorante utilizado en la tinción de Azul brillante de cresilo: BCB por sus siglas en inglés (derecha).

Evaluación de la maduración de los ovocitos mediante la tinción de Aceto orceína

Una vez finalizado el tiempo de incubación para MIV los ovocitos fueron sacados de la incubadora; de manera mecánica los ovocitos fueron separados de las células del cúmulo con ayuda de una micropipeta marca Eppendorf; una vez desnudados, los ovocitos se colocaron en un portaobjetos y se fijaron con ácido acético-etanol 1:3 por 48 a 72 horas en una cámara hermética.

Al término de dicho tiempo se agregó la tinción de aceto orceína al 1%, para ser evaluados en un microscopio de contraste de fases a 40X y se clasificaron dependiendo de su estado de maduración (Coy *et al.*, 2005).

- i) Presencia de vesícula germinal (VG) o ruptura de la misma
- ii) Meiosis I (MI)
- iii) Meiosis II (MII)
- iv) No evaluables (NE).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

En este experimento se realizó la prueba de ANOVA para la evaluación de ovocitos porcinos madurados por cada tratamiento. Aplicando niveles de significancia de $p < 0.05$. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa estadístico de SPSS v15.0 (2006, Chicago, USA).

RESULTADOS

Etapa 1. Maduración con fluido folicular porcino y 2 tratamientos hormonales

Este primer experimento fue un modelo piloto utilizando fluido folicular porcino (FFP) en lugar del Factor de Crecimiento Epidermal (EGF).

En las 3 corridas (réplicas) realizadas en la etapa 1 se utilizaron 352 ovocitos; en la corrida 1 se utilizaron 65 ovocitos, en la corrida 2 se usaron 74 y en la corrida 3 se utilizaron 85 ovocitos. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de la etapa 1 para maduración *in vitro* de ovocitos porcinos con fluido folicular.

Tratamiento	Vesícula Germinal n(%)	Metafase I n(%)	Metafase II n(%)
1 (PG600)	56 (24.6 ± 6.76)	55 (23.8 ± 13.43)	20 (8.7 ± 3.86)
2 (Merional)	47 (21.6 ± 10.33)	36 (16.6 ± 5.85)	10 (4.8 ± 4.23)

Los valores son promedios ± error estándar de la media.

Etapa 2. Maduración con 4 diferentes tratamientos hormonales

En la segunda etapa se realizaron 16 corridas (réplicas) con 4 diferentes tratamientos, obteniendo una n total de 3901 ovocitos. No hubo diferencias significativas entre tratamientos en la etapa de vesícula germinal, ni en metafase II; en la etapa de metafase I, hubo diferencias entre el tratamiento 2 (Merional) y el tratamiento 3 (PG600). Tabla 5. Figura 4, Gráfica 1.

Tabla 5. Efecto de diferentes productos hormonales sobre la maduración de ovocitos de cerda.

Tratamiento	Vesícula Germinal n(%)	Metafase I n(%)	Metafase II n(%)
1 (Novormon + Chorulon)	538 (18.8 ± 1.80)	216 (8.3 ± 1.16)ab	40 (3.2 ± 0.60)
2 (Merional)	409 (14.0 ± 1.13)	247 (9.7 ± 1.30)a	55 (3.7 ± 1.32)
3 (PG 600)	576 (18.9 ± 1.58)	152 (5.8 ± 0.77)b	56 (4.4 ± 0.94)
4 (PG 600 + Chorulon)	476 (17.2 ± 2.20)	160 (6.7 ± 0.91)ab	77 (6.5 ± 1.41)

Los valores son promedios ± error estándar de la media. Valores con letras diferentes en columna difieren significativamente ($P < 0.05$).

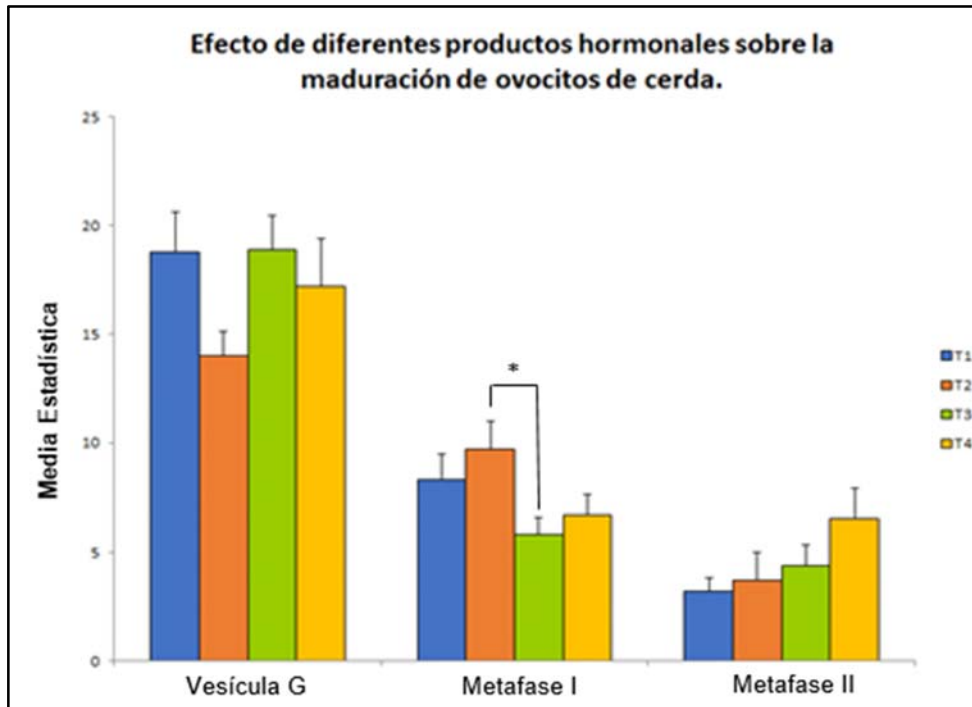


Figura 4. Gráfica 1. Efectos de cuatro tratamientos hormonales de diferentes marcas comerciales en la MIV de ovocitos de cerda. Se graficaron el promedio de los resultados obtenidos por tratamiento, evaluando Vesícula Germinal, Metafase I y Metafase II; destacando los errores estándar de cada tratamiento. (*) Muestra los tratamientos en los que se obtuvieron diferencias significativas.

Previo a la maduración, se contabilizaron los ovocitos activos metabólicamente (BCB+) que tuviesen coloración azul y los ovocitos no activos (BCB-) que no tuviesen coloración. Se observa que hay un gran porcentaje de ovocitos BCB+ después del tiempo de incubación en la tinción (Figura 5, Gráfica 2).

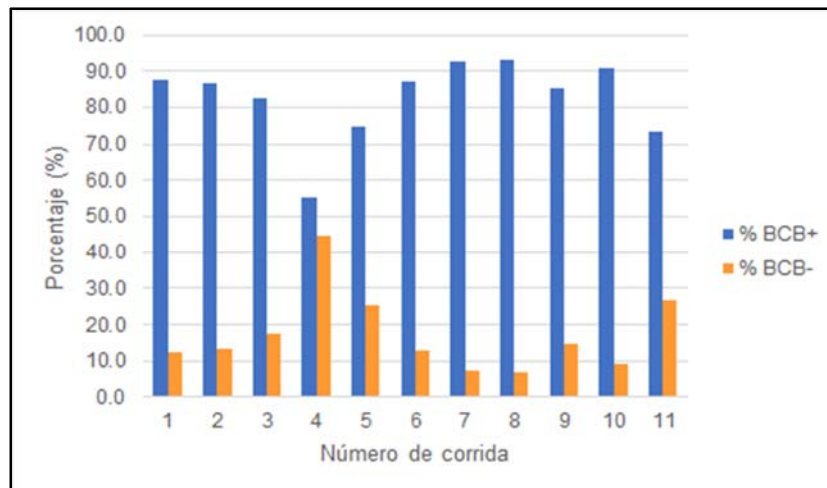


Figura 5. Gráfica 2. Resultados por corrida (replica) de la tinción azul brillante de cresilo (BCB) expresado en porcentaje

Se registró el tiempo de duración de cada corrida (replica) desde el momento de la colecta de ovarios hasta el inicio de la incubación de los ovocitos en el medio de

maduración, con el fin de descartar el tiempo del proceso como variable para la maduración. En las primeras dos corridas se observó un tiempo de proceso bastante largo, el cual se redujo 2 horas desde la corrida 3 hasta la corrida 14 y posteriormente hubo una reducción de una hora en las corridas 15 y 16 (Tabla 6).

Tabla 6. Tiempo (horas) de producción de una corrida por día.

Corrida	Tiempo (h)	Corrida	Tiempo (h)
1	7.32	9	5.27
2	7.28	10	5.14
3	5.47	11	5.08
4	5.5	12	5.46
5	5.39	13	5.18
6	5.34	14	5.07
7	5.53	15	4.18
8	5.38	16	4.35

Así mismo se registró el porcentaje de ovocitos evaluables y no evaluables por corrida, obteniendo en total 3034 ovocitos evaluables y 867 ovocitos no evaluables durante la fase 2 del trabajo experimental; se consideran ovocitos no evaluables aquellos que durante el proceso se perdieron, rompieron y/o degeneraron al momento de la tinción por lo que no pudieron ser clasificados. A medida que avanzaron las corridas, se observó menos pérdida de ovocitos, por lo que se puede suponer que las manejadoras (tesistas) adquirieron mayor habilidad a medida que avanzó el proceso experimental (Figura 6. Gráfica 3).

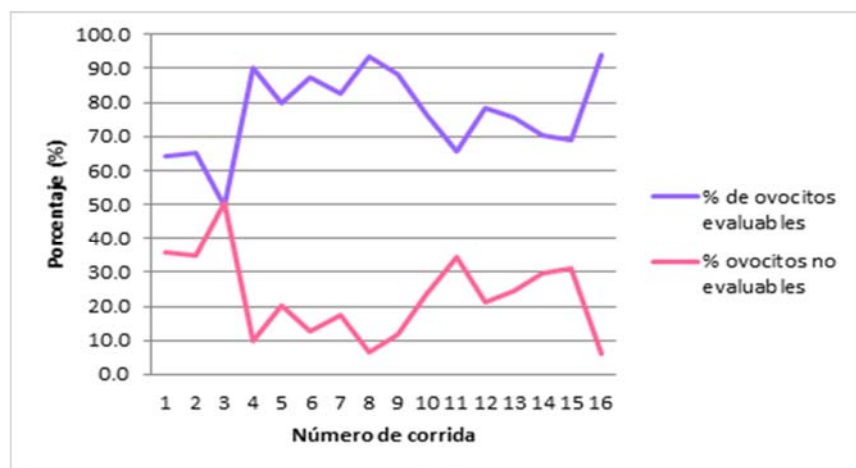


Figura 1. Gráfica 3. Porcentaje de ovocitos evaluables y no evaluables por corrida.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se obtuvo un bajo porcentaje de maduración de los ovocitos que pudo deberse a diversos factores; aunque han existido avances en el cultivo celular, aún no hay medios completamente definidos para los protocolos de producción *in vitro* de embriones porcinos, los que actualmente se utilizan son medios semi definidos.

De acuerdo con Özturkler (2002), los métodos utilizados para colección y maduración *in vitro* afectan la meiosis, así como el potencial de desarrollo de los ovocitos, sin embargo, no se reportan diferencias en maduración entre recolección con punción y corte de folículos (Fernández Reyes *et al.*, 2010); en este proyecto se usó la punción como método de recolección.

La selección de ovocitos inmaduros de acuerdo con las características morfológicas de las células del cúmulo es de las más usadas antes de la maduración ya que es fácil y rápida de evaluar (Álvarez *et al.*, 2009). Aunque hay que tomar en cuenta que esta es una evaluación subjetiva debido a que cada investigador puede percibir de diferente manera la calidad de cada ovocito. En este trabajo se eligieron los ovocitos que tuvieran tanto el citoplasma homogéneo así como la mayor cantidad de capas células del cúmulo alrededor de ellos.

A fin de disminuir esta problemática de clasificación de los ovocitos inmaduros, autores como Carrasco (2012), han reportado el uso de tinciones para evaluar la competencia ovocitaria por medio de la actividad metabólica de la célula; que obtuvo 49% BCB positivos (activos metabólicamente) de los cuales 81% de ovocitos estaba en metafase II, lo que difiere con nuestro estudio en el cual obtuvimos un porcentaje de 85 a 90% de ovocitos activos metabólicamente, pero con bajos porcentajes de ovocitos en metafase II.

Otro factor importante que influye sobre la maduración es la temperatura empleada durante la recolección y transporte de los ovarios, la cual se manejó entre 30 y 35°C sin embargo Walters y Graves (1998) realizaron una investigación en la cual aseguran que utilizando temperaturas arriba de 25°C disminuye la viabilidad de los ovocitos porcinos, siendo ésta esencial para mantener la calidad y así lograr un mayor porcentaje de maduración *in vitro*. Sin embargo, hay mucha variabilidad en los reportes respecto a la temperatura de recolección y almacenamiento: García (2014),

utilizó una temperatura de 25°C por 5 horas, en cambio Appeltant *et al.* (2015) utilizaron una temperatura de recolección de 37°C, asimismo Romero-Aguirregomez corta *et al.* (2014) utilizaron una temperatura de 38.5°C.

No solo la temperatura utilizada en el transporte de ovarios es importante, se debe considerar también durante todo el proceso para evitar choques térmicos, por lo que consideramos que un factor que pudo haber afectado nuestros resultados es la época del año en la que se trabajó, ya que fue en invierno y la temperatura ambiental pudo haber influido en cambios de temperatura de los medios utilizados, ya que el medio recién sacado de la incubadora presentaba una temperatura de 38.5°C la cual, mientras se realizaban los pases de los ovocitos, disminuyó generando, posiblemente, choques térmicos en cada cambio de caja.

Etapa 1

En la etapa 1 del proceso experimental se utilizó fluido folicular porcino en el medio de maduración, ya que según diversos autores contiene componentes fisiológicos, bioquímicos y metabólicos que incrementan la maduración del ovocito (Ducolomb, 2004); sin embargo, en este estudio se observó solo 8% de ovocitos maduros, lo cual difiere de lo reportado por Ducolomb (2004) y Wang *et al.* (1997) 64 y 87% respectivamente. La diferencia entre los resultados se puede deber a que la composición del fluido folicular porcino varía entre cerda y cerda; y éste puede contener sustancias que inhiben o detienen la meiosis en MI tal como el inhibidor de la maduración de los ovocitos u OMI por sus siglas en inglés (Gallardo-Ornelas *et al.*, 2001), así mismo de acuerdo con Gérard *et al.* (1998), contiene una proteína compleja que evita la luteinización de las células de la granulosa, la cual es un inhibidor que impide la unión de la FSH con estas células (Ducolomb, 2004), por lo que utilizar el fluido folicular porcino completo en el medio de maduración puede inhibir el progreso de la MI a MII.

Etapa 2

En la etapa 2 se utilizó Factor de crecimiento epidérmico o epidermal (EGF) como suplemento más definido con la finalidad de eliminar la variable que presenta el FFP que se presentó en la etapa 1.

Muchos estudios suplementan los medios, para favorecer la maduración de ovocitos, con hormonas FSH y LH; y otra alternativa son la eCG, hCG y hormona post menopáusica humana. El uso simple de eCG y hCG o en combinación se ha utilizado en diversos trabajos de investigación previos a este, ya sea en las mismas o en distintas concentraciones; Appeltant *et al.* (2015) obtuvieron 0.7% de ovocitos en etapa de M I utilizando 10 UI/mL de eCG (Folligon, Intervet) y 10 UI/mL de hCG (Chorulon, Intervet), lo cual es un porcentaje menor al obtenido en el presente trabajo ya que se obtuvo 8.3% de ovocitos en la misma etapa. Abeydeera *et al.* (1998) obtuvieron 24% de ovocitos madurados con 10 UI/mL eCG y 10 UI/ml de hCG, Liu *et al.* (2015) utilizaron 15 UI/mL eCG y 10 UI/mL hCG para maduración de ovocitos, sin embargo, no reportan el número de ovocitos maduros.

Cai *et al.* (2020) reportan porcentajes de ovocitos en metafase II del 90.7% utilizando eCG y hCG, siendo éstos muy superiores a los resultados que obtuvimos en el presente trabajo.

En el cultivo suplementado con HMG (Merional) se obtuvo 3.7% de ovocitos en M II, en estudios anteriores se reporta 32.1% de M II (Fernández Reyes *et al.*, 2010), utilizando los mismos parámetros de cultivo y solo variando en la temperatura de transporte.

Los resultados que se obtuvieron con Merional (tratamiento 2) son significativamente mayores que los obtenidos con PG600 (tratamiento 3) en etapa de M I, pero no hubo diferencia en metafase II, lo que significa que Merional estimuló en mayor proporción el reinicio de la metafase, pero no completó la metafase II.

Uno de los objetivos del presente trabajo fue evaluar diferentes productos comerciales, que contienen como principio activo la eCG y hCG, para considerarlos como alternativa a las hormonas FSH y LH que normalmente se utilizan en este tipo de trabajos, pero no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos utilizados en este estudio.

CONCLUSIÓN

Con este trabajo experimental se concluye que durante el proceso de maduración *in vitro* de ovocitos porcinos es importante mantener condiciones adecuadas en los medios de maduración, manipulación y transporte utilizados, así como la temperatura de los mismos para disminuir la variabilidad y obtener resultados favorables.

Los resultados obtenidos en el experimento preliminar indican que no existe diferencia en la efectividad de FFP con respecto al EGF.

La efectividad de los productos hormonales comerciales, sustitutos de LH y FSH, depende de varios factores propios del trabajo experimental, que fueron variables entre las diferentes replicas (corridas) de este trabajo.

PERSPECTIVAS

Se sugiere continuar con esta línea de investigación cuidando las condiciones de trabajo en cada etapa del proceso, minimizando las variables que generen resultados poco uniformes entre cada corrida y con eso poder determinar si los productos comerciales utilizados en este experimento son adecuados para ser utilizados en cualquier protocolo de maduración *in vitro* de ovocitos porcinos.

La estandarización de la maduración *in vitro* de ovocitos de cerda, empleando compuestos hormonales sustitutos de LH y FSH, será la base para continuar con trabajos de fertilización y desarrollo *in vitro* de embriones, con la finalidad de probar la capacidad fertilizante de espermatozoides crioconservados de cerdo, línea de investigación importante en este laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abeydeera, L. R., Wang, W. H., Cantley, T. C., Rieke, A., Prather, R. S., Day, B. N. (1998). 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 and Development: Incorporating Gamete Research* 51(4), 395-401.
2. Abeydeera, L. R., Wang, W. H., Cantley, T. C., Reike, A., Murphy, C. N., Prather, R. S., Day, B. N. (2000). Development and viability of pig oocytes matured in a protein free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology* 54: 787-797.
3. Adams, G. P., Jaiswal, R., Singh, J., Malhi, P. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69: 72-80.
4. Ahmed, T. A., Ahmed, S. M., El-Gammal, Z., Shouman, S., Ahmed, A., Mansour, R., El-Badri, N. (2019). Oocyte aging: the role of cellular and environmental factors and impact on female fertility. *Cell Biology and Translational Medicine* 8, 109-123.
5. Alvarez, G.M., Dalvit, G. C, Achi, M., Miguez, S., Cetica, P. (2009). Immature oocyte quality and maturational competence of porcine cumulus oocyte complexes subpopulations. *BioCell* 33(3): 167-177.
6. Andrés, R. R. (2001). Efecto de las células oviductales y del cumulus oophorus sobre diferentes parámetros biológicos relacionados con la fecundación *in vitro* en la especie porcina (Tesis Doctoral) Universidad de Murcia, Facultad de Veterinaria. España.
7. Appeltant, R., Beek, J., Vandenberghe, L., Maes, D., y Van Soom, A. (2015). Increasing the cAMP concentration during *in vitro* maturation of pig oocytes improves cumulus maturation and subsequent fertilization *in vitro*. *Theriogenology* 83(3), 344-352.
8. Ávalos, M. F. C. (2014). Efecto de las células del cúmulo en la viabilidad, maduración, fertilización y desarrollo embrionario después de la vitrificación de ovocitos inmaduros porcinos *in vitro* (Tesis Doctoral) Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México.
9. Barrett, K. E., Boitano, S. y Barman, S. M. (2013). *Ganong Fisiología Médica*. (24a Edición, Sección III, Capítulo 22, 400-401). McGraw Hill, México.

10. Belfiore, A. y LeRoith, D. (Eds.). (2018). Synthesis, Secretion, and Transport of Peptide Hormones. En *Principles of Endocrinology and Hormone Action*. (1a Edición, Capítulo 2, 29-32). New York: Springer. Estados Unidos.
11. Bildik, G., Akin, N., Esmailian, Y., Hela, F., Yakin, K., Onder, T., Urman, B., y Oktem, O. (2020). hCG improves luteal function and promotes progesterone output through the activation of JNK pathway in the luteal granulosa cells of the stimulated IVF cycles. *Biology of Reproduction* 102 (6), 1270-1280.
12. Brachet, J., Baltus, E., y Hanocq-Quertier, J. (1976). Inducción de la maduración (meiosis) en pequeños ovocitos de *Xenopus*. Un estudio citológico. *Sciences Naturelles* 283(3), 263–266.
13. Brackett, B. G., Bousquet, D., Boice, M. L., Donawick, W. J., Evans, J. F., Dressel, M. A. (1982) Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology of Reproduction* 27(1), 147-158.
14. Carrasco, R. (2012). Uso de azul brillante de cresilo en la selección de ovocitos bovinos: Implicancias en la maduración nuclear y citoplasmática *in vitro*. (Tesis Licenciatura) Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. Chile.
15. Cai, L., Jeong, Y. W., Hyun, S. H., Yu, I. J., Hwang, W. S., y Jeon, Y. (2020). Trehalose supplementation during porcine oocytes *in vitro* maturation improves the developmental capacity of parthenotes. *Theriogenology* 141, 91-97.
16. Chang, M.C. (1959). Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature* 184: 466-467.
17. Cheng, W. T. K., Polge, C., Moor, R. M. (1986). In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro, *Theriogenology* 25(1),146.
18. Chopineau, M., Maurel, M. C., Combarous, Y., y Durand, P. (1993). Topography of equine chorionic gonadotropin epitopes relative to the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor interaction sites. *Molecular and Cellular Endocrinology* 92(2), 229-239.
19. Cortés, V. P. (2011). Desarrollo embrionario in vitro en medio secuencial o continuo. (Tesis de Maestría) Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Zootecnia. México.
20. Coy, P., Romar, R., Payton, R. R., McCann, L., Saxton, A. M., Edwards, J. L. (2005). Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes using the S-enantiomer of roscovitine: effects on maturation, fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Reproduction* 129(1), 19-26.

21. Ducolomb, R. Y. C. (2004). Estudio de las fracciones proteínicas del fluido folicular porcino en la maduración, fertilización *in vitro* y polispermia de ovocitos de cerdo. (Tesis Doctoral) Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México.
22. Ducolomb, R. Y. C., Romo, G. S., Balcázar, S. J. A., Rodarte, C. L. F., Casas, H. E., Fragoso, G. G. C., Sciutto, C. E. L., Betancourt, R. M. (2005). Primeros cerdos nacidos en México a partir de embriones producidos *in vitro*. *Técnica Pecuaria en México* 43(3), 425-432.
23. Dunogent, L., Martínez, E., Cattaneo, A., Gnocchi, D., Irigoyen, M., Tessari, L., y Martínez, A. G. (2020). Comparación de un medio de cultivo secuencial y uno continuo para el desarrollo *in vitro* de embriones humanos. *Reproducción (Argentina)* 35(1), 1-7.
24. Egerszegi, I., Alm, H., Rátky, J., Heleil, B., Brüssow, K. P. y Torner, H. (2010). Meiotic progression, mitochondrial features and fertilisation characteristics of porcine oocytes with different G6PDH activities. *Reproduction, Fertility and Development* 22(5), 830-838.
25. Fernández Reyes, F., Hernández Pichardo, J. E., Reyes Flores, M. C. (2010). Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de cerda obtenidos por punción y corte de folículos. *Revista de Salud Animal* 32(2), 78-83.
26. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2016). La diversidad genética del ganado, clave para alimentar un planeta más caliente e inhóspito. <http://www.fao.org/news/story/es/item/380842/icode/>
27. Fowler, K. E., Mandawala, A. A., Griffin, D. K., Walling, G. A., Harvey, S. C. (2018). The production of pig preimplantation embryos *in vitro*: Current progress and future prospects. *Reproductive Biology* 18(3), 203-211.
28. Gallardo-Ornelas, L., González-Márquez, H., Ducolomb, Y., Casas, E., y Betancourt, M. (2001). Influence of porcine follicular fluid protein fractions on oocyte maturation *in vitro*. *Bioquímica* 26(3), 59-62.
29. García F. (2014). Evaluación de la producción de embriones porcinos *in vitro* con la adición de Quitosán en solución. (Tesis Maestría) Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México.
30. Gérard, N., Duchamp, G., Goudet, G., Bézard, J., Magistrini, M., y Palmer, E. (1998). A high-molecular-weight preovulatory stage-related protein in equine follicular fluid and granulosa cells. *Biology of Reproduction* 58(2), 551-557.

31. Hafez, E. S. E. (1987). *Reproduction in Farm Animals*. (5a Edición, pp. 36-45). Ed. Lea & Febiger. Filadelfia, Estados Unidos.
32. Hafez, E. S. E., y Hafez, B. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. (7a Edición, Capítulos 3 y 5, pp. 35-49 y 70-82) McGraw-Hill Interamericana. Filadelfia, Estados Unidos.
33. Henao, G., y Trujillo, L. E. (2000). Establecimiento y desarrollo de la dominancia folicular bovina. Revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 13(2), 108-120.
34. Herrick, J. R. (2019). *Cultivo comparativo de embriones*. Springer Nueva York.
35. Hunter, M. G. (2000). Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction* 5(2), 122-130.
36. Inoue, M., Naito, K., Aoki, F., Toyoda, Y. y Sato E. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote* 3(3), 265–271.
37. Instituto Nacional de Economía Social (13 de abril de 2018). *Porcicultura, una actividad milenaria*. Gobierno de México.
<https://www.gob.mx/inaes/es/articulos/porcicultura-una-actividad-milenaria?idiom=es>
38. Jiménez, L. F. y Merchant, H. (2003). *Biología celular y molecular* (1a Edición, Capítulo 22, 686-693). Pearson educación. Estado de México, México.
39. Kempisty, B., Jackowska, M., Piotrowska, H., Antosik, P., Woźna, M., Bukowska, D., Brüssow, K. P., Jaśkowski, J. M. (2011). Zona pellucida glycoprotein 3 (pZP3) and integrin $\beta 2$ (ITGB2) mRNA and protein expression in porcine oocytes after single and double exposure to brilliant cresyl blue test. *Theriogenology* 75(8), 1525-1535.
40. Kidson, A., Schoevers, E., Langendijk, P., Verheijden, J., Colenbrander, B., y Bevers, M. (2003). The effect of oviductal epithelial cell co-culture during in vitro maturation on sow oocyte morphology, fertilization and embryo development. *Theriogenology* 59(9), 1889-1903.
41. Klein, B. G. (2014). *Cunningham. Fisiología veterinaria* (5a Edición, Capítulos 35 y 36, 408-419). Elsevier. Barcelona, España.
42. Krisher, R. L. (Ed.). (2013). *Oocyte physiology and development in domestic animals*. (1a Edición, Capítulo 1, 1-14) John Wiley & Sons. Iowa, Estados Unidos.

43. Lane, M., D. K. Gardner, M. J. Hasler, and J. F. Hasler. 2003. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. *Theriogenology* 60: 407-419.
44. Liu, S., Cui, K., Li, H. L., Sun, J. M., Lu, X. R., Shen, K. Y., Liu, Q. Y. y Shi, D. S. (2015). Comparison of chemical, electrical, and combined activation methods for in vitro matured porcine oocytes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 51(2), 103-112.
45. Lozano Duran, L. (2018). Estandarización de procedimientos del Laboratorio de Inseminación Artificial Porcino de la Universidad Francisco de Paula, Santander Ocana (Tesis Doctoral). Universidad Francisco de Paula Santander Ocaña, Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente. Colombia.
46. Luna Fernández, D. F. (2011). Evaluación de los gránulos corticales durante la maduración *in vitro* e *in vivo* en ovocitos caninos y su relación con el desarrollo meiótico. (Tesis Licenciatura). Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Chile.
47. Matamoros, R. P. y Salinas, P. P. (2017). *Fundamentos de fisiología y endocrinología reproductiva en animales domésticos*. (1a Edición, Neuroendocrinología en la hembra (Primera parte) Fisiología del hipotálamo e hipófisis, pp. 35-38). Ediciones Universidad Santo Tomás. Santiago de Chile, Chile.
48. Merz, W. E. (1996). Biosynthesis of human chorionic gonadotropin: a review. *European Journal of Endocrinology* 135(3), 269-284.
49. Montero López, E. M., Martínez Gamba, R. G. y Herradora Lozano, M. A. (2015). Alternativas para la producción porcina a pequeña escala. (1a Edición, Capítulo 1, 21-29). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México.
50. Özturkler, Y. (2002). In vitro developmental potential of electro-activated porcine oocytes collected by punctation versus dissection. *Indian Veterinary Journal* 79(4), 327-330.
51. Pineda, M. H., y Dooley, M. P. (2003). *McDonald's veterinary endocrinology and reproduction* (5a Edición, Capítulo 7, 201-238). Iowa State Press. Iowa, USA.
52. Pitzel L, Ludemann S, Wuttke W. (2000). Secretion and gene expression of metalloproteinases and gene expression of their inhibitors in porcine corpora

- lutea at different stages of the luteal phase. *Biology of Reproduction* 62(5): 1121-1127.
53. Redel, BK, Spate, LD., Prather, RS. (2019). Maduración, fertilización y cultivo *in vitro* de ovocitos y embriones de cerdo. En *cultivo comparativo de embriones* (págs. 93-103). Humana, Nueva York, Estados Unidos de América.
54. Romero-Aguirregomezcorra, J., Santa, Á. P., García-Vázquez, F. A., Coy, P., Matás, C. (2014). Nitric oxide synthase (NOS) inhibition during porcine *in vitro* maturation modifies oocyte protein S-nitrosylation and *in vitro* fertilization. *PLoS One* 9(12), e115044.
55. Sagata, N. (1998). Introduction: meiotic maturation and arrest in animal oocytes. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* 9(5), 535-537.
56. Salas G. (2014). Momento del cambio de cultivo en un medio secuencial y el desarrollo temprano de embriones ovinos *in vitro*. (Tesis Maestría). Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, Edo. de México.
57. Sun, Q. Y. (2003). Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microscopy Research and Technique* 61(4), 342-348.
58. Tarazona, A., López, A., y Olivera-Angel, M. (2010). La competencia del ovocito: qué, cómo y cuándo. *Acta Biológica Colombiana* 15(3), 3-18.
59. Teteltitla, M. (2014). Evaluación de la viabilidad, maduración y efecto genotóxico en ovocitos y células del cúmulo porcino expuestos a Sulfonato de Perfluorooctano (PFOS) *in vitro*. (Tesis Maestría). Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México.
60. Tonzetich J. (2004). Orcein staining and the identification of polytene chromosomes. *Methods in Molecular Biology* 247:249-56.
61. Walters, E. M., y Graves, C. N. (1998). Transportation and storage effects on porcine ovaries. *Journal of Animal Science*, 76(Suppl 2), 69.
62. Wang, W. H., Abeydeera, L. R., Cantley, T. C., Day, B. N. (1997). Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. *Reproduction* 111(1), 101-108.
63. Whittemore, C. T. y Kyriazakis, I. (2008). *Ciencia y práctica de la producción porcina de Whittemore* (4a Edición, Capítulo 4, 140-143). John Wiley & Sons. Oxford, Reino Unido.

64. Williams, S. I., Fernández, V. C., De La Sota, R. L. (2010). Dinámica folicular y momento de la ovulación en cerdas púberes y pluríparas posdestete. *InVet*, 12(1), 33-42.
65. Wongsrikeao, P., Otoi, T., Yamasaki, H., Agung, B., Taniguchi, M., Naoi, H., Shimizu, R., Nagai, T. (2006). Effects of single and double exposure to brilliant cresyl blue on the selection of porcine oocytes for in vitro production of embryos. *Theriogenology*, 66(2), 366-372.
66. Yoshioka K, Suzuki C, Itoh S, Kikuchi K, Iwamura S, Rodriguez-Martinez H. (2003). Production of piglets derived from *in vitro-produced* blastocysts fertilized and culture in chemically defined media: effects of theophylline, adenosine and cysteine during *in vitro* fertilization. *Biology of Reproduction* 69(6): 2092-2099.

ANEXOS

Medio de manipulación de los ovocitos

Medio TL-HEPES-PVA

Se utiliza para lavado de complejos ovocitos células del cúmulo antes del cultivo en medio de maduración.

Componente	PM	mM	g/500ml
NaCl	58.45	114.00	3.33165
KCl	74.55	3.20	0.1193
NaH ₂ PO ₄	120.00	0.34	0.0204
Lactato de Na*	112.10	10.00	0.7 ml
MgCl ₂ . 6H ₂ O	203.30	0.50	0.05085
HEPES	238.30	10.00	1.1915
Piruvato de Na	110.00	0.20	0.0110
Sorbitol	182.20	12.00	1.0930
NaHCO ₃	84.00	2.00	0.084
CaCl ₂ .2H ₂ O**	147.00	2.00	0.147
Gentamicina			0.0125
PVA			0.0500

*60% (v/v)

** Agregar al final

Ajustar el pH a 7.3-7.4 con Na OH o HCl 1N

Esterilizar por filtración en membranas de 0.22 µm

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

Medio para maduración *in vitro* libre de proteína para ovocitos porcinos

TCM 199 Modificado

TCM 199

PVA	0.1%
D-Glucosa	3.05mM
Piruvato de sodio	0.91mM
Gentamicina	10µg/ml

El medio se suplementa con:

EGF	10 ng/ml
Cisteína	0.57 mM
eCG	0.5 µg/ml
hCG	0.5 µg/ml
HMG	0.5 µg/ml