

1
524

90893

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Casa abierta al tiempo

**“ESTUDIO DE LAS FRACCIONES PROTEÍNICAS DEL FLUIDO
FOLICULAR PORCINO EN LA MADURACIÓN, FERTILIZACIÓN *IN*
VITRO Y POLISPERMIA DE OVOCITOS DE CERDO”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T A

M. EN C. YVONNE CLAUDINE DUCOLOMB RAMÍREZ

DIRECTORES DE TESIS:

DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE

DR. HUMBERTO GONZÁLEZ MÁRQUEZ

ASESORA:

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

México, D. F.

Diciembre de 2004

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

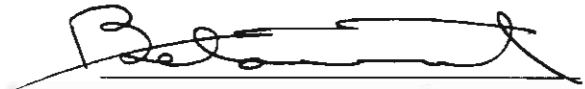
El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco
aprobó la tesis que presentó:

Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez

El día 16 de diciembre del año de 2004

Sinodales:

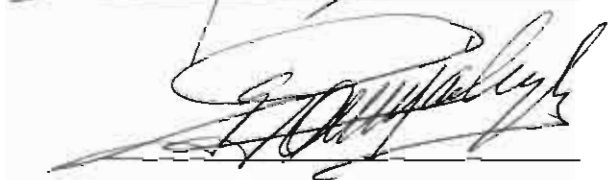
Dr. José Miguel Betancourt Rule (Presidente)



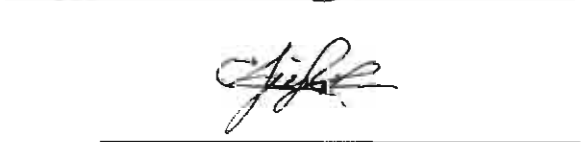
Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano (Secretario)



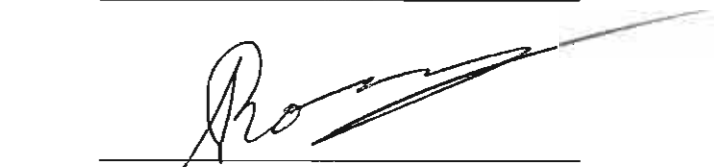
Dr. Humberto González Márquez (Vocal)



Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana (Vocal)



Dr. Rubén Román Ramos (Vocal)



COMITÉ TUTORAL:

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Profesor Titular "C", Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II

Dr. Humberto González Márquez

Profesor Titular "C", Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I

ASESORA:

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Profesor Titular "C", Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I

SINODALES:

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Profesor Titular "C", Facultad de Estudios Superiores – Zaragoza. UNAM
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I

Dr. Rubén Román Ramos

Profesor Titular "C", Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Celular

Departamento de Ciencias de la Salud

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Agradecimientos

Deseo expresar mi más profundo reconocimiento al Dr. Miguel Betancourt y al Dr. Humberto González por la acertada dirección de este trabajo de tesis, por el apoyo y la confianza que en todo momento me brindaron. Agradezco a la Dra. Reyna Fierro por la estrecha colaboración en la realización de esta tesis, su apoyo y valiosos consejos.

Muchas gracias porque ante todo, me han ofrecido su sincera amistad.

Gracias al Dr. Mario Altamirano y al Dr. José Alfredo Medrano por la revisión de este trabajo, los valiosos consejos y aceptar ser miembros de mi jurado.

Doy las gracias al Dr. Rubén Román ya que con su ayuda, eficiencia y optimismo hizo posible la culminación de este trabajo.

Quiero agradecer al Dr. Salvador Romo el apoyo incondicional, los consejos que con entusiasmo me dio a lo largo de este trabajo.

Agradezco al M. en C. Eduardo Casas por el apoyo que constante y amablemente me brindó. Mi agradecimiento al Sr. Jorge Lodigiani por el excelente trabajo realizado en la digitalización de las imágenes. Agradezco al Rastro los Arcos (Edo. de México) por las facilidades proporcionadas para la obtención de los ovarios porcinos. Esta tesis fue apoyada parcialmente con el subsidio número 1407 de CONACYT.

Dedicatorias

Con cariño y gratitud a mi madre que siempre ha sido ejemplo de amor y entrega sin límite.

A la memoria de mi padre y abuelos

Con especial cariño a mis hijos Yves-Albert y Aline.

A mi nieto Luis Fernando que tanto alegra mi vida.

A mis queridos hermanos Adriana y Félix y a mi cuñada Claudia.

A mis sobrinos Arturo, Mariana, Michèle, Stephanie y
Jean-Claude.

Con todo mi amor a Salvador

A todos mis amigos del Laboratorio de Biología Celular a quienes admiro profundamente, hacen mi vida placentera y me dan su ayuda continua:

Miguel, Reyna, Rocío, Cristina, Edmundo, Eduardo, Ernesto,
Humberto, Irma, Leonor, Edith, Lety y Héctor.

A mis alumnas Alejandra, Lupita y Alicia.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE CUADROS	XII
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	XIII
RESUMEN	XVI
ABSTRACT	XVIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. OVOGÉNESIS Y FOLICULOGÉNESIS	1
1.1.1. Ovulación.....	3
1.2. FERTILIZACIÓN	4
1.2.1. Interacción del espermatozoide con las células del cúmulo	5
1.2.2. Interacción de los espermatozoides con la Zona Pelúcida.....	6
1.2.3. Fusión del espermatozoide con el ovocito	7
1.2.4. Activación del ovocito.....	7
1.2.5. Reacción cortical y bloqueo a la polispermia	9
1.2.6. Descondensación del núcleo del espermatozoide	10
1.2.7. Desarrollo del pronúcleo y singamia.....	11
1.3. FLUIDO FOLICULAR	12
1.3.1. Componentes del fluido folicular.....	12
1.3.2. Funciones del fluido folicular.....	16
1.4. FERTILIZACIÓN IN VITRO	17
1.4.1. Aplicaciones de la FIV.....	17
1.4.2. Importancia de la FIV en la producción de cerdos transgénicos.....	19
2. ANTECEDENTES.....	22
2.1. RELACIÓN ENTRE MADURACIÓN IN VITRO, FERTILIZACIÓN IN VITRO Y FLUIDO FOLICULAR.....	22

2.2.	COMPONENTES DEL FLUIDO FOLICULAR Y SUS EFECTOS EN LA MADURACIÓN IN VITRO Y FERTILIZACIÓN IN VITRO	24
2.3.	EFECTOS DEL FFP Y LAS GONADOTROPINAS	26
2.4.	EFECTO DE LAS DIMENSIONES FOLICULARES.....	27
2.5.	POLISPERMIA	28
3.	JUSTIFICACIÓN	32
4.	HIPÓTESIS	34
5.	OBJETIVOS	35
5.1.	OBJETIVO GENERAL	35
5.2.	OBJETIVOS PARTICULARES	35
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	36
6.1.	COLECCIÓN DEL FFP.....	36
6.2.	MADURACIÓN Y FERTILIZACIÓN IN VITRO	36
6.2.1.	<i>Maduración de ovocitos in vitro</i>	37
6.2.2.	<i>Fertilización in vitro</i>	39
6.3.	ANÁLISIS BIOQUÍMICO DEL FLUIDO FOLICULAR	42
6.3.1.	<i>Cuantificación de proteínas</i>	42
6.3.2.	<i>Cromatografía de intercambio aniónico de proteínas</i>	42
6.3.3.	<i>Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS)</i>	44
6.4.	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	45
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
7.1.	EFECTO DEL FFP DE FOLÍCULOS DE DIFERENTE TAMAÑO EN LA MADURACIÓN, FERTILIZACIÓN Y POLISPERMIA	47
7.1.1.	<i>RESULTADOS</i>	47
7.1.2.	<i>DISCUSIÓN</i>	53
7.2.	FRACCIONAMIENTO DEL FLUIDO FOLICULAR PORCINO POR MEDIO DE CROMATOGRFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO	64
7.2.1.	<i>RESULTADOS</i>	64

7.2.2.	<i>DISCUSIÓN</i>	68
7.3.	EFFECTO DE LAS FRACCIONES PROTEÍNICAS DEL FFP EN LA MADURACIÓN, FERTILIZACIÓN Y POLISPERMIA	71
7.3.1.	<i>RESULTADOS</i>	71
7.3.2.	<i>DISCUSIÓN</i>	81
8.	CONCLUSIONES	90
9.	PERSPECTIVAS	91
10.	REFERENCIAS.....	92
11.	ANEXOS	106
11.1.	MEDIO TL-HEPES-PVA.....	106
11.2.	MEDIO PARA MADURACIÓN IN VITRO LIBRE DE PROTEÍNAS PARA OVOCITOS PORCINOS	108
11.3.	MEDIO AMORTIGUADO CON TRIS MODIFICADO	110
11.4.	SUPLEMENTOS DEL TBMM.....	111
11.5.	MEDIO PARA LAVADO DE ESPERMATOZOIDES DPBS	112
11.6.	MEDIO NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY (NCSU) 23	113
12.	DIFUSIÓN DE RESULTADOS.....	114
12.1.	ARTÍCULO CIENTÍFICO	114

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. COMPLEJO OVOCITOS-CÉLULAS DEL CÚMULO MADURADO <i>IN VITRO</i> . A, SIN GONADOTROPINAS NI EGF (100X); B, CON GONADOTROPINAS Y EGF (100X); C, CON FFP MÁS GONADOTROPINAS Y EGF (200X); D, AUMENTO DE UN OVOCITO MADURADO CON FFP (400X).....	48
FIGURA 2: EFECTO DE LA FSH, LH Y EGF (CSH), DEL FFP1 Y FFP2 EN LOS MEDIOS DE MIV SOBRE LA MADURACIÓN, FERTILIZACIÓN Y POLISPERMIA. SSH SE NORMALIZÓ AL 100%.	53
FIGURA 3. CROMATOGRFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO DEL FFP, EMPLEANDO UNA COLUMNA DE AMINAS CUATERNARIAS EN DONDE SE OBSERVA EL AGRUPAMIENTO DE LAS FRACCIONES EN CINCO REGIONES.	64
FIGURA 4. ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS EN MEDIO REDUCTOR DE FFP EN DONDE SE OBSERVAN LAS BANDAS PROTEÍNICAS DE LAS CINCO REGIONES.....	66
FIGURA 5. COMPARACIÓN ENTRE EL MEDIO DE MIV CON SUPLEMENTOS HORMONALES Y EL MEDIO SIN SUPLEMENTOS.....	74
FIGURA 6. COMPARACIÓN ENTRE EL MEDIO DE MIV CON FFP Y EL MEDIO SIN SUPLEMENTOS HORMONALES.	75
FIGURA 7. COMPARACIÓN ENTRE EL MEDIO DE MIV CON R1 Y EL MEDIO SIN SUPLEMENTOS HORMONALES.	76
FIGURA 8. COMPARACIÓN ENTRE EL MEDIO DE MIV CON R2 Y EL MEDIO SIN SUPLEMENTOS HORMONALES.	77
FIGURA 9. COMPARACIÓN ENTRE EL MEDIO DE MIV CON R3 Y EL MEDIO SIN SUPLEMENTOS HORMONALES.	78
FIGURA 10. COMPARACIÓN ENTRE EL MEDIO DE MIV CON R4 Y EL MEDIO SIN SUPLEMENTOS HORMONALES.	79

FIGURA 11. COMPARACIÓN ENTRE EL MEDIO DE MIV CON R5 Y EL MEDIO SIN SUPLEMENTOS HORMONALES. 80

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. COMPONENTES Y METABOLITOS DEL FLUIDO FOLICULAR CON ACTIVIDAD FISIOLÓGICA.....	15
CUADRO 2. PROTOCOLO DEL FRACCIONAMIENTO DE LA CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO.	43
CUADRO 3. PORCENTAJES DE MADURACIÓN, FERTILIZACIÓN Y POLISPERMIA EN OVOCITOS CULTIVADOS EN MEDIO DE MIV CON Y SIN GONADOTROPINAS Y CON FFP DE FOLÍCULOS DE DIFERENTE TAMAÑO.....	49
CUADRO 4. PORCENTAJES NORMALIZADOS DE MADURACIÓN, FERTILIZACIÓN Y POLISPERMIA EN OVOCITOS CULTIVADOS EN MEDIO DE MIV CON DIFERENTES SUPLEMENTOS. EL GRUPO SSH SE TOMÓ COMO EL TESTIGO NEGATIVO.....	50
CUADRO 5. ANÁLISIS DE LA CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO DE LAS PROTEÍNAS DEL FFP	65
CUADRO 6. MASA MOLECULAR RELATIVA DE LAS BANDAS PROTEÍNICAS DEL FFP Y DE LAS FRACCIONES DE CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO DETERMINADAS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS EN CONDICIONES REDUCTORAS.	67
CUADRO 7. PROMEDIO DE LOS PORCENTAJES DE MADURACIÓN, FERTILIZACIÓN Y POLISPERMIA EN OVOCITOS CULTIVADOS EN MEDIO DE MIV CON LAS FRACCIONES PROTEÍNICAS DEL FFP.	72
CUADRO 8. PORCENTAJE NORMALIZADO DE MADURACIÓN, FERTILIZACIÓN Y POLISPERMIA EN OVOCITOS CULTIVADOS EN MEDIO DE MIV CON O SIN SUPLEMENTOS HORMONALES, Y 10% DE FFP O 10% DE CADA UNA DE LAS 5 REGIONES PROTEÍNICAS.	73

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BSA	Albúmina sérica de bovino
CC	Células del cúmulo
COC	Complejo-ovocito-células del cúmulo
CSH	Medio de maduración con gonadotropinas y EFG
CTC	Cobre/tartrato/carbonato
DAG	Diacilglicerol
DPBS	Solución amortiguadora de fosfatos de Dulbecco
eCG	Gonadotropina coriónica equina
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FCS	Suero fetal de bovino
FF	Fluido folicular
FFp	Fluido folicular porcino
FFp1	Fluido folicular porcino proveniente de folículos menores de 5 mm
FFp2	Fluido folicular porcino proveniente de folículos mayores de 5 mm
FIV	Fertilización <i>in vitro</i>
FPM	Factor promotor de la maduración
FSH	Hormona foliculo estimulante
GC	Gránulos corticales

GSH	Glutati3n
IGF	Factor de crecimiento parecido a insulina
IP ₃	Inositoltrifosfato
LH	Hormona luteinizante
MI	Metafase I
MII	Metafase II
MIV	Maduraci3n <i>in vitro</i>
M _r	Masa relativa
NCSU-23	Medio de cultivo "North Carolina State University"
OMI	Factor Inhibidor de la Maduraci3n del Ovocito
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PNf	Pron3cleo femenino
PNm	Pron3cleo masculino
PVA	Polivinilalcohol
R1	Regi3n 1
R2	Regi3n 2
R3	Regi3n 3
R4	Regi3n 4
R5	Regi3n 5
SDS	Dodesil sulfato de sodio
SSH	Medio de maduraci3n sin gonadotropinas ni EGF
TBMm	Medio amortiguado con Tris modificado

TCM-199	Medio de cultivo de tejidos 199
TNF	Factor de necrosis tumoral
VG	Vesícula germinal
ZP	Zona pelúcida

RESUMEN

Los programas de maduración y fertilización *in vitro* (MIV y FIV) presentan problemas en los porcinos, estos son los bajos porcentajes de maduración citoplásmica y los altos índices de polispermia. Hasta la fecha no está claro si estas dificultades están relacionadas con las condiciones de cultivo durante la maduración. Se ha demostrado que el fluido folicular porcino (FFp) incrementa la maduración nuclear y citoplásmica del ovocito, evaluada por la formación del pronúcleo masculino (PNm) después de la FIV. Sin embargo, existe controversia sobre sus efectos dependiendo del tamaño del folículo del que proviene el FFp. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del FFp, completo y fraccionado, adicionado en el medio de maduración, en la MIV, FIV y la polispermia. Los ovocitos porcinos se obtuvieron de cerdas prepúberes. El FFp se obtuvo por la punción y aspiración de folículos menores de 5 mm (FFp1) y de 5.1 a 8 mm de diámetro (FFp2), el FFp de las dos categorías presentó una concentración de 60 ± 5 mg/ml de proteína. El testigo negativo se normalizó al 100%. Tanto el FFp1 como el FFp2 adicionados al medio de MIV y en presencia de LH, FSH y EFG aumentaron la maduración nuclear (80%), la citoplásmica se incrementó entre 371 y 400%, la fertilización entre 165 y 183% y la polispermia entre el 57 y 35% con relación al testigo negativo. Al no haber diferencia significativa entre el FFp de los dos tipos foliculares se eligió el FFp1 para fraccionarlo por cromatografía de intercambio aniónico. Se obtuvieron 5 fracciones (R1, R2, R3, R4, R5), y las que tuvieron un efecto más importante fueron R1, R3 y R5. La R1 incrementó la fertilización en un 30% y disminuyó la polispermia también en un 30%, esta última de la misma manera que el FFp completo. La R3 tuvo un efecto inhibitorio en la maduración nuclear y citoplásmica. La R5 incrementó el reinicio de la meiosis (29%), favoreció la maduración nuclear (20%) e incrementó la formación del PNm (32%). Las fracciones se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS para relacionar el patrón de bandas

proteínicas con el efecto en la maduración, fertilización y polispermia. En la R1 se encontró una banda con M_r de 45-46 kDa que no apareció en otras fracciones del FFp por lo que puede estar relacionada con la disminución de la polispermia. La R3 presentó 2 bandas (71 y 19 kDa) no presentes en las otras regiones que pueden relacionarse con su efecto inhibitorio. La R5 presentó dos bandas de 139 y 124 kDa no encontradas en otras fracciones, estas proteínas pueden estar implicadas con el efecto positivo sobre la maduración que se observó con el FFp y esta región. Este trabajo demuestra que los componentes proteínicos del FFp son relevantes en la MIV y FIV y la polispermia del ovocito porcino. Se requiere realizar un análisis para identificar las proteínas que forman estas fracciones para que de manera aislada en los medios de maduración se pruebe su efecto sobre la MIV, FIV y polispermia.

Palabras clave: maduración *in vitro*, fertilización *in vitro*, fluido folicular, fracciones proteínicas del fluido folicular, ovocitos porcinos



ABSTRACT

In vitro maturation and fertilization (IVM, IVF) programs in pigs have some problems, these are low rates of cytoplasmic maturation and high percentages of polyspermy. To the present time, it is not clear if these difficulties are related to culture conditions during maturation. It has been shown that porcine follicular fluid (pFF) increases the oocyte nuclear and cytoplasmic maturation, evaluated by the development of the male pronucleus (mPN) after IVF. However, there is controversy about its effects, depending on the follicular size from where the pFF is obtained. The objective of this study was to evaluate the effect of complete and fractionated pFF, on IVM, IVF and polyspermy, when added to the maturation medium. Porcine oocytes were collected from prepuberal gilts. The pFF was obtained by puncture of follicles smaller than 5 mm (pFF1) and from 5.1 to 8 mm in diameter (pFF2), the pFF from both categories showed a protein concentration of 60 ± 5 mg/ml. The negative control was normalized as 100%. Both pFF1 and pFF2 when added to the IVM medium and in the presence of LH, FSH and EGF increased nuclear maturation (80%), cytoplasmic maturation increased between 371 and 400%, fertilization increased between 165 and 183% and polyspermy between 57 and 73%, as compared to the negative control. Since no significant differences were found between pFF of the two follicular types, pFF1 was selected to be fractionated by anionic exchange chromatography. Five fractions were obtained (R1, R2, R3, R4, R5), those with the most important effect were R1, R3 and R5. R1 increased fertilization by 30% and decreased polyspermy also by 30%, the latter one in the same manner as the complete pFF. R3 had an inhibitory effect on nuclear and cytoplasmic maturation. R5 increased the reinitiation of meiosis (29%), nuclear maturation (20%) and mPN development (32%). The fractions were analyzed by electrophoresis in polyacrylamide gel in presence of SDS to relate the protein band pattern to the effect on maturation, fertilization and polyspermy. In R1 a band of M_r from 45-46 kDa was found, this did not appear in other pFF fractions, for which it may be related to the

reduction of polyspermy. R3 showed 2 bands (71 and 19 kDa) not present in the other regions, which may be related with its inhibitory effect. R5 showed two bands of 139 and 124 kDa not found in other fractions, these proteins may be implicated with the positive effect on maturation observed in pFF and in this region. This study shows that the protein components of pFF are relevant for the IVM, IVF and polyspermy of the porcine oocyte. It is required to perform analyses to identify the proteins that compose these fractions, so that in an isolated manner its effect can be tested in maturation media on IVM, IVF and polyspermy.

Key words: *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization, follicular fluid, follicular fluid protein fractions, porcine oocytes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. OVOGÉNESIS Y FOLICULOGÉNESIS

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

La ovogénesis es la formación y la maduración del gameto de las hembras que se inicia en la etapa embrionaria. Las ovogonias son las células precursoras de los ovocitos y surgen de las células germinales a partir del saco vitelino formado del intestino posterior del embrión. Las ovogonias son diploides ($2n$) y se encuentran en el ovario, dentro del folículo primario donde se dividen mitóticamente. La producción de ovogonias termina antes del nacimiento, por lo que al momento de nacer, ya tienen un número predeterminado de gametos potenciales (Baker, 1982).

Después de la proliferación mitótica, las ovogonias se convierten en ovocitos primarios. En este estado se inicia la primera división meiótica, que en la pubertad formará al ovocito secundario y al primer cuerpo polar. En esta primera división se separan los cromosomas homólogos, se reduce el número cromosómico y la célula se vuelve haploide (n). La segunda división meiótica se inicia después de la primera, es en este punto donde ocurre la separación de las cromátidas hermanas, produciéndose la formación del segundo cuerpo polar, sin embargo, esta última división sólo se completará hasta el momento en que ocurra la fertilización (Baker, 1982; Betancourt y col 2003).

El crecimiento del folículo se inicia al mismo tiempo que el del ovocito, posteriormente, el crecimiento del ovocito se lleva a cabo más lentamente y el del folículo prosigue. Después de que se forman los ovocitos primarios, éstos se rodean de una capa sencilla de células epiteliales aplanadas y se establece el folículo primordial o primario que se encuentra en el parénquima ovárico. La mayoría de los folículos que inician su desarrollo se vuelven atrésicos, es decir que degeneran. En la mayor parte de las especies los primeros folículos en

crecimiento aparecen en el ovario durante los primeros días después del nacimiento, aunque en los primates pueden presentarse antes del nacimiento (Baker, 1982; Bearden y Fuquay, 1982; Betancourt y col 2003).

El ovocito alojado dentro del folículo primario aumenta su tamaño y las células foliculares que lo circundan emiten prolongaciones citoplásmicas hacia el ovocito estableciendo entre ellas uniones de comunicación. El contacto entre el ovocito y las células foliculares es importante para el desarrollo y la viabilidad del ovocito, ya que a través de las uniones comunicantes recibe nutrientes como piruvato y precursores metabólicos dentro de los que se encuentran aminoácidos y nucleótidos. En esta etapa se forma la zona pelúcida (ZP) que es una matriz extracelular compuesta por glicoproteínas (Betancourt y col 2003; Dunbar y col 1980).

Posteriormente, el ovocito cesa de crecer, las células foliculares que lo rodean continúan dividiéndose, adquieren una forma cuboidal y forman el *cumulus oophorus* o células del cúmulo (CC). Durante el crecimiento folicular, a medida que se multiplican las células foliculares se forma un espacio entre ellas que se llena de un líquido con una constitución similar a la del suero sanguíneo que es modificado por el ambiente folicular y que constituye el fluido folicular (FF). A medida que aumenta la entrada de este fluido, aumenta la cavidad y se forma el antro folicular. En esta etapa el folículo ya maduro es clasificado como folículo terciario o de Graaf. El folículo terciario está formado por varias capas celulares: una capa exterior constituye la teca externa, por debajo de ésta se encuentra la teca interna, una lámina basal y hacia el interior del folículo está situada la granulosa que rodea al antro (Baker, 1982; Bearden y Fuquay, 1982; Carolan y col 1996; Hafez y Hafez, 2000b).

Al aumentar el tamaño del antro, el ovocito adquiere una posición lateral en el folículo y queda rodeado por varias capas de células de la granulosa, las células que tienen contacto con el ovocito constituyen la corona radiada que junto con las CC forman el complejo ovocito-células del cúmulo (COC) (Baker, 1982).

El crecimiento preantral del folículo es independiente de las gonadotropinas, ya que la extirpación de la hipófisis no altera su crecimiento inicial. Sin embargo, el control de la fase final del crecimiento folicular es determinado por la influencia de las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), cuya función en ese momento es la de inducir la síntesis de esteroides por parte de las células de la teca interna. En cada ciclo reproductor, bajo la influencia de la FSH liberada por la hipófisis, los folículos en crecimiento son estimulados para que continúen su crecimiento y alcancen su maduración (Baker, 1982; Hafez y Hafez, 2000b).

1.1.1. Ovulación

El comienzo de la maduración preovulatoria es producido por la elevación repentina de gonadotropinas, especialmente de LH. En respuesta al aumento de la hormona aumenta la cantidad del FF en el antro, como consecuencia el tamaño del folículo aumenta (Fulka y col 1989). Durante esta etapa las células que están en contacto con el ovocito adquieren una forma columnar. El área celular que se encuentra rodeando el ovocito forma un pequeño tallo y el ovocito solo queda rodeado por la corona radiada y las CC. Al finalizar este periodo el COC puede quedar libre en el FF (Baker, 1982).

Al terminar el crecimiento folicular, la acción de la LH hace que se presente la ovulación por mecanismos que aún no están bien dilucidados. Hay una expansión del folículo debido a la actividad de las enzimas proteolíticas, aumenta la permeabilidad vascular, la presión del FF y se presenta la isquemia de los capilares del folículo (Baker, 1982; Hafez y Hafez, 2000b; Shimada y col 2001).

Con el pico preovulatorio de la LH, el núcleo del ovocito que hasta ese momento se encontraba en estado de Vesícula Germinal (VG), en la etapa de diplóteno de la profase de la primera división meiótica, reinicia la meiosis (Baker, 1982; Hafez y Hafez, 2000b; Shimada y col 2001)

La liberación de las gonadotropinas suprime un factor inhibitorio conocido como Inhibidor de la Maduración del Ovocito (OMI) que se encuentra en el FF y que es secretado por las células de la granulosa. La reanudación de la meiosis se

caracteriza por la desaparición de la VG (Fulka y col 1989; Planchot y Mandelbaum, 1990). Durante esta etapa se condensan los cromosomas. Al final de la primera división meiótica, sin que haya una interfase el ovocito prosigue hasta la metafase II (MII), etapa en la cual en la mayoría de los mamíferos ocurre la ovulación. La culminación de la división meiótica se conoce como maduración meiótica o nuclear.

En la mayoría de los mamíferos la ovulación se lleva a cabo durante la metafase de la segunda división meiótica. Sólo cuando el ovocito es fertilizado se completa esta división y se expulsa el segundo cuerpo polar. (Austin, 1982).

1.2. FERTILIZACIÓN

La fertilización es el proceso de la reproducción sexual en el que se unen un ovocito y un espermatozoide y comienza cuando el semen es depositado en el tracto reproductor de la hembra. Cuando los gametos se ponen en contacto en el oviducto de la hembra ocurren una serie de eventos sucesivos que conducen a la fertilización, a la formación de un cigoto y posteriormente al desarrollo de un nuevo individuo que tiene un contenido genético diferente al de los progenitores (Austin, 1982; Wassarman y col 2001; Yanagimachi, 1994). Desde que la fertilización se observó por primera vez hace más de cien años en invertebrados, ha sido objeto de intensos estudios valiéndose de técnicas como la microscopía óptica y electrónica, bioquímica, biología molecular y la fertilización *in vitro* (FIV). Todo esto ha sido necesario para descifrar los procesos que se llevan a cabo desde que interaccionan los gametos hasta que se produce el desarrollo embrionario temprano en la etapa de blastocisto (Betancourt y col 1993; Betancourt y col 2003; Yanagimachi, 1994).

El ovocito es transportado en la dirección correcta por las secreciones del oviducto, por el movimiento de los cilios que lo recubren y por contracciones musculares de la pared del oviducto. De este modo los ovocitos alcanzan el sitio de la fertilización que en la mayoría de los mamíferos es en el ámpula, una porción amplia del oviducto, donde por lo general se encuentran ya los espermatozoides (Austin, 1982).

Hay evidencias que indican que los espermatozoides se dirigen al ovocito por medio de factores quimiotácticos que se encuentran en el oviducto (Wassarman y col 2001), algunos de estos factores pueden provenir del FF (Serrano y col 2001) que acompaña al ovocito en el momento de la ovulación. De los millones de espermatozoides que son eyaculados dentro del aparato reproductor femenino sólo algunos llegan al sitio de la fertilización (Hafez y Hafez, 2000a).

1.2.1. Interacción del espermatozoide con las células del cúmulo

Antes de establecer contacto con el ovocito, el espermatozoide penetra a través de las CC que están inmersas en una matriz de ácido hialurónico conjugado con proteínas. Esta matriz es secretada por dichas células al momento de reiniciarse la meiosis. Las CC se expanden antes de la ovulación para permitir el paso de los espermatozoides siendo esta característica un indicio externo de la maduración del ovocito (Yanagimachi, 1994).

Existía la idea de que miles de espermatozoides se ponían en contacto con el ovocito, en realidad eso sólo sucede en condiciones *in vitro*. En condiciones naturales, *in vivo*, pocos espermatozoides se ponen en contacto con el ovocito, en algunos casos la proporción puede ser de 1:1, esto se debe a que son pocos los espermatozoides que cruzan las CC (Betancourt y col 2003; Yanagimachi, 1994).

Los mecanismos por los cuales los espermatozoides atraviesan las CC no son claros. Hay algunas hipótesis que indican que el movimiento mecánico es indispensable para la penetración de esta estructura, sin embargo hay evidencias de que las enzimas contenidas en el acrosoma como la hialuronidasa, la acrosina, la β -galactosidasa y la arilsulfatasa pueden ser las responsables de la capacidad de penetración, ya que cuando se emplearon inhibidores de la hialuronidasa se impidió la penetración de los espermatozoides (Yanagimachi, 1994).

En algunas especies como ratones, porcinos y bovinos la presencia de las CC hace más eficiente la FIV por la existencia de factores solubles secretados por

ellas, que estimulan la movilidad espermática y promueven la reacción acrosomal. Se han propuesto otras funciones de las CC como son la de prolongar la vida fértil del ovocito, la de hacer más lento el proceso de endurecimiento de la ZP después de la ovulación y la de proporcionar un medio para la selección de espermatozoides más vigorosos y permitir que éstos penetren al ovocito con menor esfuerzo. Todas estas funciones permiten que la fertilización sea más eficiente (Yanagimachi, 1994).

1.2.2. Interacción de los espermatozoides con la Zona Pelúcida

La ZP en los mamíferos tiene diversas funciones como el reconocimiento especie-específico con el espermatozoide, la inducción de la reacción acrosomal y evitar la polispermia. Durante las primeras etapas del desarrollo embrionario la ZP protege al embrión, sin ella los blastómeros podrían disociarse, o adherirse a las paredes del oviducto y perecer, además ayuda a la implantación del embrión en el útero. También es una protección contra bacterias, leucocitos y ataque inmunológico. La ZP tiene familias de glicoproteínas que varían en su peso molecular dependiendo de la especie (Wassarman, 1989). En el porcino, la ZP está constituida por 71% de proteínas y 19% de carbohidratos como fucosa, manosa, galactosa, ácido N-acetil-glucurónico, ácido siálico, y sulfatos (Dunbar y col 1980).

Los espermatozoides que han penetrado las CC se unen a la ZP por medio de la interacción de las moléculas de la superficie de ambas células. En murinos y otras especies, la familia ZP3 es el ligando inicial para que la membrana espermática se una a la ZP antes de que se lleve a cabo la reacción acrosomal. Otra función de este componente es disparar este proceso (Yanagimachi, 1994).

Durante la reacción acrosomal se liberan hialuronidasa y proteasas que son esenciales para la penetración del espermatozoide a través de la ZP, el segundo ligando que se une a la membrana interna del espermatozoide reaccionado es la familia ZP2 (Betancourt y col 2003; Yanagimachi, 1994).

Una vez que el espermatozoide se une a la ZP debe atravesarla. Se han formulado dos hipótesis para explicar este proceso, una de ellas indica que la fuerza mecánica del espermatozoide es suficiente para romper los puentes disulfuro de las glicoproteínas de la ZP. La otra postula que los espermatozoides que no llevan a cabo la reacción acrosomal no pueden penetrarla y que la acrosina hidroliza todas las glicoproteínas de la ZP. Estas dos hipótesis no son excluyentes para propiciar que el espermatozoide se desplace a través de la ZP (Yanagimachi, 1994).

1.2.3. Fusión del espermatozoide con el ovocito

Una vez que el espermatozoide ha pasado a través de la ZP, cruza rápidamente el espacio perivitelino, su cabeza se une a la membrana plasmática del ovocito (oolema) y el cuerpo completo se incorpora al citoplasma (ooplasma).

En todos los animales, excepto en los euterios, la membrana interna del acrosoma es la primera en fusionarse con el oolema. En los euterios, como murinos, bovinos y porcinos la región ecuatorial de la membrana plasmática del espermatozoide es la que se fusiona con el oolema. La región posterior de la cabeza y la cola son incorporadas por medio de la fusión de sus membranas con el oolema, y la región anterior de la cabeza con la parte interna del acrosoma expuesta, es fagocitada por el ovocito (Betancourt y col 2003; Yanagimachi, 1994).

1.2.4. Activación del ovocito.

Al fusionarse el espermatozoide con el ovocito, se produce una serie eventos de tipo morfológico y bioquímico que constituyen el proceso de activación. Estos cambios conducen a la diferenciación del ovocito fertilizado llamado cigoto, la división embrionaria y la formación de un nuevo individuo con complemento genético diploide.

Después de que se produce el rompimiento de la VG, se inicia la maduración del ovocito y como resultado de la primera división meiótica se libera el primer cuerpo polar. Inmediatamente después, se inicia la segunda división

meiótica que se detiene en MII y sólo continúa con la penetración del espermatozoide (Yanagimachi, 1994).

En los mamíferos la prueba más clara de que el ovocito ha sido activado es la liberación de los gránulos corticales (GC) para impedir el acceso a espermatozoides adicionales. Después de la penetración del espermatozoide al ovocito, la segunda metafase se reanuda, se completa la meiosis y se libera el segundo cuerpo polar. El complemento haploide del ovocito se transforma en el pronúcleo femenino (PNf). Simultáneamente, el espermatozoide en el ooplasma se transforma y su núcleo se descondensa para dar origen al pronúcleo masculino (PNm). La activación del ovocito se conoce más detalladamente en erizos de mar y anfibios. En los mamíferos el criceto es la especie que más se ha estudiado, en éste, la activación del ovocito ocurre 5 minutos después de la fusión con el espermatozoide (Yanagimachi, 1994).

Al fusionarse el espermatozoide con el oolema, se activa la ruta del inositoltrifosfato (IP_3) que provoca un aumento de Ca^{+2} en el citosol, esta reacción se inicia desde la región donde ocurrió la penetración y se extiende hacia el resto del ovocito. La liberación de los iones de Ca^{+2} produce la exostosis de los GC y pulsos periódicos de hiperpolarización en la membrana plasmática. Los cambios que se realizan en el plasmalema son debidos a la activación de la proteína G. La proteína cinasa C es activada por el diacilglicerol (DAG) provocando un rompimiento en el equilibrio de la fosforilación y desfosforilación de algunas proteínas, lo que conduce a la modulación de canales de calcio en la membrana y la inactivación del factor promotor de la maduración (FPM) y la del factor citostático. Estos cambios y el aumento en el pH conducen al progreso de la MII y la formación y liberación del segundo cuerpo polar (Yanagimachi, 1994).

En la mayoría de las especies los ovocitos que no son fertilizados no se activan y el huso metafásico se desintegra; sin embargo en algunos ovocitos, cuando envejecen puede haber una activación espontánea.

En algunas especies de mamíferos la activación de los ovocitos puede lograrse mediante la estimulación eléctrica o mecánica y dividirse por

partenogénesis sin la participación del espermatozoide, llevando a cabo las primeras divisiones embrionarias antes de que perezcan (Gilbert, 1994; Yanagimachi, 1994).

1.2.5. Reacción cortical y bloqueo a la polispermia

Durante la ovogénesis y la maduración meiótica los GC se originan a partir del Aparato de Golgi, aumentan en número y se dirigen a la periferia del ovocito como un proceso preliminar a la fertilización (Wassarman, 1989; Yanagimachi, 1994). Los GC se han encontrado en los ovocitos de todos los mamíferos y contienen mucopolisacáridos, proteasas, activador del plasminógeno tisular, fosfatasa ácida y peroxidasa (Betancourt y col 2003; Yanagimachi, 1994). Con la penetración del espermatozoide los GC se fusionan con el oolema y liberan su contenido enzimático hacia el espacio perivitelino alterando las propiedades de la ZP impidiendo la entrada de espermatozoides adicionales, lo que se conoce como polispermia. Esta puede producirse tanto *in vivo* como *in vitro* cuando los ovocitos fertilizados son inmaduros o han envejecido, la reacción de los GC es defectuosa y su exocitosis es deficiente, permitiendo el paso de dos o más espermatozoides (Yanagimachi, 1994).

En condiciones *in vivo*, la polispermia puede producirse cuando un gran número de espermatozoides alcanza el sitio de la fertilización. También se presenta cuando el apareamiento es tardío o la temperatura de la hembra es elevada por fiebre o hay un incremento en la temperatura ambiental (Bearden y Fuquay, 1982; Yanagimachi, 1994). En cualquiera de los casos la polispermia provoca que el cigoto tenga dotaciones cromosómicas triples o múltiples por lo que los embriones pueden presentar mosaismo o ploidías, produciendo embriones poliploides que no son viables. La polispermia puede ser la causa de la disminución en la tasa de concepción y el aumento en la mortalidad embrionaria (Han y col 1999b).

En los mamíferos se conocen poco los mecanismos moleculares que ocurren durante la exocitosis de los GC. En los ovocitos de criceto fertilizados *in vitro* se ha observado que la exocitosis comienza menos de un minuto después de

la unión del espermatozoide con el ovocito. Sólo los ovocitos que han completado su maduración son capaces de presentar exocitosis de los GC cuando son fertilizados, esta facultad comienza durante la MI y alcanza su nivel normal con la MII (Yanagimachi, 1994).

Existen dos mecanismos para impedir la entrada de más de un espermatozoide. Cuando el espermatozoide se ha fusionado con el ovocito ocurren cambios bioquímicos y biofísicos en la membrana plasmática del ovocito y en la ZP. El primer bloqueo ocurre a nivel del ooplasma, ya que la entrada del espermatozoide provoca una despolarización transitoria de ésta reduciendo la posibilidad de fusionarse con otros espermatozoides. Este bloqueo se produce un minuto después de que ocurre la penetración. Este mecanismo no se ha comprendido completamente pero se sabe que es independiente de la exocitosis de los GC. El segundo bloqueo es provocado por la liberación de enzimas de los GC hacia el espacio perivitelino que modifican la composición de la ZP produciendo una reacción de zona o reacción cortical. Los receptores para los espermatozoides se inactivan y la ZP se endurece (Alberts y col 1994; Yanagimachi, 1994).

Las enzimas de los GC modifican la ZP3 involucrada en la unión del espermatozoide cortando los residuos terminales de los oligosacáridos. La ZP2 se modifica perdiendo su capacidad de unión. En todos los mamíferos tanto la ZP como la membrana plasmática actúan en conjunto para evitar la polispermia, aunque en algunas especies puede predominar alguno de estos mecanismos (Yanagimachi, 1994).

1.2.6. Descondensación del núcleo del espermatozoide

Durante la transformación de las espermatidas en espermatozoides, las histonas son reemplazadas por protaminas ricas en arginina, serina y cisteína lo que provoca la compactación de la cromatina. Al madurar los espermatozoides en el epidídimo, en las protaminas hay una sustitución de los grupos tilo por enlaces disulfuro, lo que permite que los núcleos de los espermatozoides sean resistentes

a cambios físicos y químicos, y su cabeza tenga la rigidez necesaria para atravesar la ZP (Yanagimachi, 1994).

Después de que el espermatozoide penetra en el ovocito y lo activa, la envoltura nuclear espermática se rompe comenzando por la región del segmento ecuatorial y el material nuclear se incorpora al ovocito antes de que el núcleo espermático se descondense (Yanagimachi, 1994).

Para que se pueda descondensar la cabeza del espermatozoide en el ovocito se requiere que haya ocurrido el rompimiento de la VG y que esté presente en el citoplasma del ovocito un componente llamado factor de descondensación del núcleo del espermatozoide. Los ovocitos inmaduros no pueden inducir la descondensación nuclear del espermatozoide ni la formación del PNm (Yanagimachi, 1994).

En el citoplasma del ovocito, el espermatozoide pierde las protaminas del núcleo y hay una reducción de los enlaces disulfuro. Un factor importante para la descondensación del núcleo es la presencia de glutatión en el citoplasma del ovocito, que actúa en la reducción de estos enlaces. Durante la descondensación del núcleo espermático las protaminas son sustituidas por histonas y las proteínas de la cromatina son remplazadas por proteínas provenientes del ovocito (Yanagimachi, 1994).

1.2.7. Desarrollo del pronúcleo y singamia

Mientras el ovocito completa la segunda división meiótica y se forma el PNf, la cromatina descondensada del espermatozoide forma el PNm. En los mamíferos la fusión de los dos pronúcleos dura aproximadamente dos horas. En el citoplasma del ovocito existe una sustancia llamada factor de crecimiento del pronúcleo que es producida cuando el ovocito madura en presencia de las CC. Este factor no es especie específico, porque permite la formación del PNm en ovocitos desprovistos de ZP que son penetrados por espermatozoides heterólogos. En el ovocito, la síntesis de glutatión es indispensable para la formación del PNm (Niwa, 1993).

Después de la fusión de los gametos, en los dos pronúcleos se inicia la síntesis de ADN. La etapa en que éstos son visibles se conoce como pronuclear o precigótica. En un inicio los pronúcleos recién formados se encuentran alejados uno del otro, posteriormente se sitúan al centro del ovocito y se ven muy cercanos, sus superficies forman interdigitaciones, las membranas nucleares se entrelazan y se fusionan en un proceso que recibe el nombre de singamia. La envoltura nuclear desaparece y los cromosomas paternos y maternos se unen. De esta manera se forma el cigoto, en el que se restaurará el número cromosómico diploide. La singamia es considerada como el último paso de la fertilización y el inicio del desarrollo embrionario (Yanagimachi, 1994).

1.3. FLUIDO FOLICULAR

El FF se origina por la trasudación del plasma sanguíneo periférico a través de la lámina basal del folículo, donde es modificado por las actividades metabólicas foliculares y se acumula en el antro. Está formado por esteroides y glicoproteínas que son sintetizados y secretados por las células de la teca y de la granulosa. También están presentes elementos no esteroides con actividades fisiológicas y una sustancia estimuladora de la luteinización de las células de la granulosa.

Durante el crecimiento folicular se establece un equilibrio entre el suero y el FF, las concentraciones de metabolitos entre éstos son similares entre sí y con las secreciones del oviducto (Bisseling y col 1997; Dode y Graves, 2002; Gérard y col 1998; Hafez y Hafez, 2000b).

El FF tiene factores reguladores que estimulan o inhiben el ciclo folicular (Arici y col 1997; Brüssow y col 1999a; Brüssow y col 1999b; Ding y Foxcroft, 1994; Hafez y Hafez, 2000b; Kawano y col 1997).

1.3.1. Componentes del fluido folicular

El FF contiene compuestos de gran importancia fisiológica que se encuentran en concentraciones similares a las del suero sanguíneo (Cuadro1). Las concentraciones de progesterona y de 17 β -estradiol en el FF son más altas

de las que hay en la sangre. En los folículos antrales grandes conforme se aproxima la ovulación, el FF contiene concentraciones altas de 17 β -estradiol y progesterona, lo que no ocurre en los folículos pequeños (Hafez y Hafez, 2000b).

El FF contiene sustancias inhibitoras entre las que se encuentra un péptido con un peso molecular aproximado de 15 kDa que es el inhibidor de la maduración de los ovocitos (OMI), y éste los mantiene en la primera división meiótica. Contiene además una proteína compleja que evita la luteinización de las células de la granulosa, un inhibidor que impide la unión de la FSH con las células de la granulosa. También se ha identificado la presencia de inhibina, hormona que inhibe la secreción de FSH y de relaxina, un polipéptido de aproximadamente 9 kDa (Gérard y col 1998).

En el FF humano, se han encontrado factor de necrosis tumoral (TNF)- α , IL-1 e IL-6 y la citocina que es un factor estimulador de colonias de macrófagos. Estos componentes pueden tener un papel importante en la regulación del desarrollo de los folículos y la atresia en el ovario (Büscher y col 1999). También se ha demostrado la presencia de citocinas, como son los factores de crecimiento parecido a insulina I y II (IGF-I e IGF-II), factor de crecimiento derivado de plaquetas AB (PDGF-AB), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor transformador de crecimiento (TGF). La presencia de las citocinas parece estar influenciada por hormonas como la FSH y la gonadotropina de mujer menopáusica (hMG), o la combinación de ambas (Hammadeh y col 2000).

El FF tiene componentes fisiológicos, bioquímicos y metabólicos que incrementan la maduración del ovocito (Funahashi y Day, 1993b; Naito y col 1988; Vatzias y Hagen, 1999; Yoshida y col 1992b).

El FF contiene proteoglicanos y hialuronano. La cantidad de proteoglicanos en el folículo puede ser de importancia en la trompa de Falopio *in vivo*, se piensa que pueden proteger al ovocito a su paso hacia la cavidad uterina. Existe la posibilidad de que los proteoglicanos mantengan una matriz gelatinosa proporcionando un medio adecuado para la captura del ovocito por parte de la fimbria. La función de estas macromoléculas no se ha establecido, pero se sabe

que se encuentran durante la formación del antro, son las responsables de la viscosidad del FF y de mantener el volumen del folículo durante su desarrollo. La síntesis y la acumulación del hialuronano están asociadas a la expansión de las CC. El proteoglicano condroitín sulfato puede ser uno de los componentes del FF que aumenta el potencial de fertilización del espermatozoide (Eriksen y col 1997).

Cuadro 1: Componentes y metabolitos del fluido folicular con actividad fisiológica.

Componentes bioquímicos	Compuestos
Aminoácidos	Asparagina, treonina, glutamina, ácido glutámico, alanina, glicina
Enzimas	Intracelulares y extracelulares
Carbohidratos	Glucosa, fructosa, fucosa, galactosa, manosa
Glicoproteínas	Glucosamina, galactosamina, ácido hialurónico, heparina y plasminógeno
Gonadotropinas	FSH, LH /prolactina
Esteroides	Colesterol, andrógenos, progestinas, estrógenos
Prostaglandinas	PGE, PGF _{2α}
Minerales y sales	Sodio, potasio, magnesio, zinc, cobre, calcio, azufre, cloruro, fosfato inorgánico, fósforo
Inmunoglobulinas	La Ig G es la proteína predominante La IgA está presente en cantidades menores a IgG La concentración de IgG en el fluido aumenta conforme los folículos crecen hasta alcanzar las dimensiones preovulatorias
Otras Proteínas	Albúmina, fibrinógeno, lipoproteínas, péptidos

Adaptado de Hafez y Hafez (2000b).

1.3.2. Funciones del fluido folicular

El FF realiza diversas funciones entre las que se encuentran el inicio del crecimiento folicular, la esteroidogénesis y la regulación del funcionamiento de las células de la granulosa (Hafez y Hafez, 2000a). El FF está relacionado con la maduración nuclear y citoplásmica del ovocito, la ovulación, el transporte del ovocito a través del oviducto, promueve la formación de los pronúcleos y la preparación del folículo para la formación del cuerpo lúteo (Funahashi y Day, 1993b; Naito y col 1988; Vatzias y Hagen, 1999; Yoshida y col 1992b).

Durante la ovulación una cantidad de FF es descargada con el ovocito hacia el oviducto y junto con las secreciones del oviducto, provee un microambiente en el que ocurren la capacitación espermática, la fertilización y el desarrollo embrionario temprano, ya que en el FF hay factores importantes en la maduración citoplásmica que pueden tener una influencia en el desarrollo embrionario (Brüssow y col 1999a; Brüssow y col 1999b; Carolan y col 1996; Funahashi y Day, 1993b; Vatzias y Hagen, 1999).

Hay evidencias de que el FF tiene actividad quimiotáctica atrayendo a los espermatozoides al sitio de la fertilización. Esta actividad parece estar asociada al ácido hialurónico y a progesterona presentes en el FF humano, además se aisló una proteína de 8.6 kDa del FF porcino (FFp) que puede tener ese efecto (Serrano y col 2001) .

El FF puede favorecer la movilidad espermática, la capacitación y la reacción acrosomal *in vitro* del espermatozoide en muchas especies, incluyendo al ratón, criceto, porcino y bovino. En el humano la preincubación de los espermatozoides con FF incrementa la penetración (Ghetler y col 1990; Tesarik, 1985).

El FF bovino obtenido de folículos grandes, adicionado al medio de incubación de espermatozoides tuvo un efecto favorable en la FIV (Brüssow y col 1999a; Choi y col 1998; Hafez y Hafez, 2000b).

1.4. FERTILIZACIÓN IN VITRO

La FIV involucra la unión de un espermatozoide con un ovocito fuera del aparato reproductor femenino en condiciones de laboratorio. El embrión resultante es transferido a una hembra receptora. Esta puede ser la misma que aportó el gameto o una sustituta para que se lleve a cabo la implantación, gestación y el nacimiento de una cría.

Los estudios de FIV en mamíferos se iniciaron en el siglo XIX cuando Schenk, en 1878 obtuvo ovocitos de conejo y de cobayo, los incubó *in vitro* con espermatozoides observando la formación del cuerpo polar y al cabo de un tiempo de cultivo, observó las primeras divisiones celulares (Seitz y col 1973). Los primeros nacimientos de animales domésticos por medio de FIV se produjeron a mediados del siglo pasado, cuando se logró el nacimiento de conejos (Chang, 1959). El primer nacimiento de un ser humano por medio de FIV y transferencia embrionaria fue logrado por Steptoe y Edwards en 1978 (Steptoe y Edwards, 1978). Fue en 1982 cuando se logró el nacimiento de la primera ternera producida por FIV (Brackett y col 1982). Los primeros nacimientos de cerdos obtenidos por este método fueron reportados por Cheng y col (1986), posteriormente por Mattioli y col (1989) y Yoshida y col (1993).

El progreso de la FIV en animales domésticos fue más lento que en las especies de mamíferos utilizadas en el laboratorio. Las diferencias que existen en la capacitación espermática, la dificultad para obtener cantidades adecuadas de ovocitos maduros capaces de ser fertilizados y el bajo número de embriones obtenidos para ser transferidos a hembras receptoras son los principales problemas encontrados (Calderon y Healy, 1993).

1.4.1. Aplicaciones de la FIV

La FIV ha sido muy útil en diferentes áreas de la reproducción asistida. En humanos surgió inicialmente como un tratamiento para resolver la infertilidad femenina producida por algunas enfermedades como endometriosis, factor de infertilidad cervical y fallas ováricas, pero pronto fue aplicada para otro tipo de

problemas como son algunos casos de infertilidad masculina y la infertilidad de origen inmunológico (Calderon y Healy, 1993). Además, la FIV ha permitido estudiar y entender aspectos biológicos básicos en la maduración de gametos, estudiar los mecanismos celulares y moleculares en la interacción de los gametos durante la fertilización y el conocimiento más preciso de los eventos que se llevan a cabo durante el desarrollo embrionario temprano (Abeydeera y col 1998a; Abeydeera y col 1998b; Abeydeera y col 1998c; Abeydeera y col 1998d; Abeydeera y col 2000; Betancourt y col 1993; Fierro y col 1994).

La FIV es una herramienta muy útil como una alternativa para estudiar los aspectos reproductivos que podrían ser utilizados para la conservación de especies en peligro de extinción. En animales en cautiverio la FIV también es de gran ayuda en la resolución de problemas reproductivos ya que pueden padecer de subfertilidad o infertilidad. Esta disminución en la fertilidad puede deberse a incompatibilidad entre el macho y la hembra en el momento del apareamiento o al estrés que produce el cautiverio, por lo que la FIV es una alternativa para que los animales que se encuentran en zoológicos puedan reproducirse, especialmente cuando se trata de ejemplares de gran valor y/o con bajo índice de reproducción (Wildt, 1990).

Los progresos alcanzados en la FIV permiten que los ovocitos fertilizados lleguen a mórula y blastocisto. En estos estados de desarrollo, los embriones pueden ser transferidos al útero de una hembra receptora empleando métodos quirúrgicos o no quirúrgicos. Por el contrario, la transferencia de embriones en estados más tempranos de desarrollo debe hacerse en forma quirúrgica para depositarlos en el oviducto, lo cual dificulta la técnica (Wilmut y Clark, 1991).

Actualmente, la demanda de la FIV en diferentes especies de animales domésticos se ha incrementado ya que ha hecho posible la obtención de una gran cantidad de cigotos que son la base para la aplicación de las diferentes biotecnologías, que desde el punto de vista económico y biológico actualmente ya es una realidad (Bremel y col 2001; Gordon, 1994; Romo, 1997; Romo y col 2002).

En las especies domésticas la demanda de FIV se ha incrementado y ha contribuido al avance de otras metodologías como la transgénesis, el sexado de embriones y la transferencia nuclear o clonación. Además, por medio de FIV se puede obtener un gran número de cigotos y embriones en estado temprano de desarrollo (Betthausen y col 2000; Polejaeva y col 2000; Romo, 1993; Toyoda y Naito, 1990; Weidle y col 1991). La FIV también ha contribuido al desarrollo de las diferentes técnicas de transgénesis que permiten la modificación genética de un organismo mediante la introducción de ADN exógeno que contiene genes específicos o modificaciones genéticas mediante la eliminación o modificación de algún gen. La capacidad de cambiar la naturaleza genética se ha extendido a los animales domésticos como el bovino, ovino y porcino (Houdebine, 2002; Houdebine y col 2002; Murray, 1999; Wilmut y Clark, 1991; Wilmut y Whitelaw, 1994).

1.4.2. Importancia de la FIV en la producción de cerdos transgénicos

El cerdo es un modelo adecuado para realizar estudios sobre la reproducción como son el reconocimiento y la interacción de los gametos en el momento de la fertilización y el desarrollo embrionario. En la actualidad ya es posible la creación de cerdos transgénicos, que pueden expresar el gen promotor de la hormona del crecimiento que les permite ganar más peso y aumentar su eficiencia alimenticia. La expresión de estos genes produce una reducción en la grasa del lomo, la cual es una característica deseable desde el punto de vista productivo (Pursel y col 1989).

La glándula mamaria en el porcino puede ser usada para producir proteínas recombinantes de uso farmacéutico. Se han logrado producir cerdas transgénicas que expresan el gen para producir la proteína C humana en la leche que, administrada como un anticoagulante en el humano que padece la ausencia congénita de esta proteína, evita una coagulación descontrolada y la muerte. En la leche porcina también se ha logrado producir el factor VIII de coagulación para tratar la hemofilia A (Niemann y Reichelt, 1993).

Otra área en la que los animales transgénicos, especialmente los cerdos, tendrá un gran impacto, será en el desarrollo de modelos de enfermedades genéticas humanas. Hasta ahora los ratones han sido el principal modelo, aunque no el más adecuado para estudiar enfermedades como la arteriosclerosis, anemia falciforme, enfermedad de Alzheimer, enfermedades autoinmunes, linfáticas, dermatitis y cáncer de próstata. Muchos de estos modelos tendrán que ser llevados a cabo en animales domésticos para poder ser útiles para el humano. El cerdo puede ser un modelo apropiado para solucionar una afección humana conocida como retinitis pigmentosa, debido a la similitud y al tamaño del ojo entre el hombre y el porcino (MacKenzie y col 2003; Wall, 1996; Wall, 1997).

Los avances en las tecnologías transgénicas permitirán que en unos años, se puedan producir cerdos modificados genéticamente que sirvan como donadores de órganos para ser trasplantados a los humanos (Edwards y col 2003). Estos órganos podrían ser de uso temporal, hasta que se obtenga un órgano humano apropiado, sin embargo, la tendencia futura de esta tecnología es el desarrollo de animales que produzcan órganos transgénicos que puedan emplearse en trasplantes permanentes (Mollnes y Fiane, 2003; Niemann y Reichelt, 1993; Niemann y Kues, 2003; Niemann y col 2003; Wall, 1996). El cerdo ofrece ventajas para llevar a cabo estos estudios, ya que tiene grandes semejanzas anatómicas, fisiológicas y bioquímicas con el ser humano, además, produce un mayor número de crías que otros animales domésticos y son una especie en la que es fácil la crianza y manutención.

Los animales modificados genéticamente pueden ser una propuesta interesante para incrementar la resistencia a ciertas enfermedades. Se pueden transferir genes de resistencia que produzcan ARN contra virus, que codifiquen para anticuerpos monoclonales específicos, que expresen linfocinas o receptores de linfocitos T (Houdebine y col 2002). La producción de cerdos transgénicos resistentes a ciertas enfermedades específicas requiere más estudios a fin de vencer los obstáculos que se han presentado, sin embargo, no deja de ser importante considerar los enormes beneficios que se obtendrían al lograr éxito con estas investigaciones. Ya se han realizado intentos para incrementar la resistencia

del cerdo hacia la influenza A por microinyección de genes de ratón. También existen trabajos que intentan desarrollar cerdos transgénicos resistentes a la cisticercosis (Fragoso y col 1998).

Para la producción de cerdos transgénicos es de gran relevancia mejorar la eficiencia de la FIV, incrementando los porcentajes de ovocitos madurados y fertilizados, y disminuyendo la polispermia, para producir embriones en cantidades suficientes que después sean utilizados en las técnicas de transgénesis.

2. ANTECEDENTES

La FIV en cerdos es de gran importancia, sin embargo existen pocos reportes de lechones nacidos vivos a partir de ovocitos madurados y fertilizados *in vitro* por lo que aún se realizan investigaciones para elucidar cuales son las técnicas más adecuadas para incrementar el éxito que se ha tenido hasta la fecha (Funahashi y col 1996; Kikuchi y col 1999; Mattioli y col 1989; Yoshida y col 1993).

La FIV es más eficiente cuando los ovocitos se maduran *in vivo*. En el humano existe la infraestructura y la tecnología para llevarse a cabo. En el caso de algunas especies domésticas como el bovino se pueden obtener ovocitos maduros directamente de los ovarios y en forma no quirúrgica por medio de aspiración guiada por ultrasonido. Sin embargo en otras especies como el porcino esto no es posible. El cerdo es utilizado generalmente para consumo alimenticio por lo que la mayor parte de los animales son sacrificados antes de que alcancen la madurez sexual. Por esta razón, en el caso del porcino para llevar a cabo la FIV es común la obtención de ovocitos a partir de las hembras sacrificadas en el rastro, lo que permite la obtención de un número ilimitado de ovarios de los cuales se pueden obtener numerosos ovocitos que pueden ser madurados en condiciones de laboratorio. A pesar de esto hasta la fecha, la maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos aún no alcanza la eficiencia adecuada para que después de ser fertilizados produzcan embriones viables.

2.1. RELACIÓN ENTRE MADURACIÓN IN VITRO, FERTILIZACIÓN IN VITRO Y FLUIDO FOLICULAR

Para incrementar la MIV de los ovocitos se han realizado diversas modificaciones de los métodos de cultivo a fin de incrementar la eficiencia de fertilización. Una de estas modificaciones consiste en realizar cocultivos con células foliculares, incluyendo células de la teca y de la granulosa. También se han modificado los medios de maduración, fertilización y desarrollo embrionario (Abeydeera y col 1998b; Ding y Foxcroft, 1994; Mattioli y col 1989).

En la actualidad, los medios de cultivo presentan una situación particular, ya que se están eliminando los componentes biológicos, con objeto de crear medios definidos que puedan producir resultados más constantes y reproducibles para la maduración del ovocito, la fertilización y el desarrollo embrionario (Iwasaki y col 1998). Para obtener medios de maduración definidos se han eliminando el FF y el suero fetal de bovino (FCS) como fuentes de proteínas, substituyéndolas por polivinil alcohol (PVA) y suplementándolos con EGF, cisteína, glucosa y piruvato, además de LH y FSH (Abeydeera y col 1998c; Abeydeera y col 1998d; Wang y Niwa, 1995; Wang y col 1997b).

Algunos de los suplementos naturales como el FF de especies como el bovino y porcino en los medios de maduración, aún se encuentran en estudio. Existen trabajos en donde se muestra el efecto benéfico del FF en los medios de maduración ya que puede incrementar la maduración nuclear, citoplásmica y el desarrollo embrionario (Abeydeera y col 1998b; Dell'Aquila y col 1997; Funahashi y Day, 1993a; Khatir y col 1997; Naito y col 1988; Romero-Arredondo y Seidel, 1994; Yoshida y col 1992b), y en los de fertilización donde puede mejorar la capacidad fertilizante del espermatozoide por lo que puede ser de gran utilidad para mejorar la eficiencia de la producción de embriones *in vitro* (Eriksen y col 1997; Revelli y col 1999).

El FF provee el ambiente adecuado para que se lleve a cabo la maduración del ovocito lo que tiene implicación en la fertilización y el desarrollo embrionario. En la fertilización asistida en el humano se ha demostrado que puede incrementar el desarrollo del embrión y aumentar la tasa de gestación (Arici y col 1997). El FF de varias especies mejora la maduración. En el bovino el FF incrementó la MIV, la FIV y el porcentaje de mórulas y blastocistos (Carolan y col 1996; Romero-Arredondo y Seidel, 1994; Sirard y col 1995).

Debido a que en el cerdo se presentan dificultades entre las que se encuentran los bajos porcentajes en la formación de PNm durante la fertilización de los ovocitos madurados *in vitro* y altos índices de polispermia, se están haciendo esfuerzos para solucionarlas. El FFp puede inducir la maduración de los

ovocitos *in vitro*, aumentar el porcentaje de la formación de los pronúcleos femenino y masculino, mejorar la capacidad del desarrollo embrionario y reducir la polispermia (Funahashi y Day, 1993b; Naito y col 1988; Vatzias y Hagen, 1999; Yoshida y col 1992b).

Al probar el FF equino en el medio de maduración y su efecto en la FIV y en la ICSI se encontró un aumento en la fertilización con esta última técnica en comparación con la FIV, por lo que se sugiere que el FF equino puede contener sustancias específicas involucradas con la maduración citoplásmica no relacionadas con las estructuras externas del ovocito (Dell'Aquila y col 1997).

El FFp y la cisteína promueven la maduración citoplásmica del ovocito (Funahashi y Day, 1993a). Naito y col (1990), encontraron que los ovocitos porcinos madurados *in vitro* presentaban bajos índices en la formación del PNm a menos de que fueran madurados en presencia de FFp o de células de la granulosa provenientes del folículo ovárico porcino, y que la presencia de factor(es) secretado(s) por las células de la granulosa acumulados en el FFp estimularon la formación del PNm (Iritani y col 1978; Motlik y Fulka, 1974; Naito y col 1990).

2.2. COMPONENTES DEL FLUIDO FOLICULAR Y SUS EFECTOS EN LA MADURACIÓN IN VITRO Y FERTILIZACIÓN IN VITRO

Naito (1990), examinó el efecto del FF colectado de folículos porcinos medianos (2-5 mm) y grandes (>5 mm), y de bovino (10-20 mm) en ovocitos porcinos madurados y fertilizados *in vitro*. Los resultados indicaron que el FF tuvo un efecto positivo sobre la formación del PNm, este efecto se incrementó al aumentar la concentración, sin diferencia entre las especies de las que provenía, indicando que hay factores en el FF que no son especie-específicos y que el bovino tenía al igual que el porcino, componentes similares capaces de incrementar la maduración nuclear y citoplásmica.

El efecto fue más efectivo al emplear el FF obtenido de los folículos medianos. Este efecto se mantuvo después de someter al FF a calentamiento a 56° C durante 30 min, sugiriendo que las sustancias efectivas son termoestables. La ultrafiltración del FF produjo componentes con peso molecular mayor de 12 kDa que incrementaron la formación del PNm en comparación con los de menos de 25 kDa que no fueron efectivos (Naito y col 1990).

Yoshida y col (1992b), observaron que el FFp completo o sus fracciones obtenidas por ultrafiltración, filtración en gel o cromatografía de intercambio iónico en el medio de maduración, incrementaron la maduración, la fertilización y el desarrollo embrionario *in vitro*. Sin embargo, en este estudio, la eficacia del FF para mantener la maduración nuclear en los ovocitos porcinos se redujo después del tratamiento con calor a 56°C durante 30 min, pero esta actividad no se alteró cuando se eliminó la parte lipídica. En este estudio se determinó que el FFp contiene sustancias ácidas con un peso molecular de 10 a 200 kDa que promueven la maduración del ovocito. Posteriormente, Yoshida y col (1993), reportaron que la adición de la fracción de este peso molecular en una proporción del 10% al medio de maduración propició después de la FIV la obtención de embriones que produjeron lechones vivos.

Daen y col (1994), analizaron las sustancias presentes en el FFp que pueden tener un efecto positivo en la expansión de las CC y la formación del PNm cuando forman parte de los suplementos del medio de maduración. Encontraron una fracción menor de 6.5 kDa obtenida por ultracentrifugación, termoestable después del calentamiento a 100°C por 15 min y de carácter no proteínico que promovió la expansión de las CC.

Se ha sugerido que los glicosaminoglicanos, principales componentes del FF entre los que están el condroitin sulfato y el heparán sulfato producidos por las células de la granulosa en respuesta a FSH, son los que junto con la inhibina producida por las células foliculares de la granulosa pueden ser candidatos para ser los factores que tienen un efecto en el FF (Naito y col 1990).

Existen trabajos en los que se ha reportado que el FF puede tener un efecto inhibitorio en la reanudación de la meiosis. El FF bovino colectado a las 0 y 4 horas después del pico de la LH presentó una actividad inhibitoria *in vitro* en la maduración nuclear, que ya no estuvo presente 8 horas después del aumento de la LH. Sin embargo, el FF colectado 20 horas después del pico estimuló la reanudación de la meiosis y produjo un aumento en el porcentaje de ovocitos que alcanzaron la MII (Romero-Arredondo y Seidel, 1994).

2.3. EFECTOS DEL FFp Y LAS GONADOTROPINAS

Se ha examinado el efecto del FFp suplementado con gonadotropinas en la maduración y en la formación del PNm, reportándose un aumento en la proporción de ovocitos que alcanzaron la MII al ser madurados en FF suplementado con FSH (89%) y hGC (85%), en comparación con aquellos ovocitos también provenientes de folículos de tamaño mediano pero cultivados sin gonadotropinas que tuvieron una menor proporción de maduración nuclear (36%). Además, después de la fertilización, la proporción de ovocitos con PNm se incrementó al 81% cuando la maduración se llevó a cabo con FF y FSH (Naito y col 1988).

El FF contiene muchos factores aún no caracterizados que pueden actuar de manera sinérgica con el EGF. En el ratón la expansión de las CC requiere del inhibidor de inter- α - tripsina que está presente en el suero y en el FF y estabiliza la matriz extracelular de las CC a través de su unión directa con el ácido hialurónico (Abeydeera y col 2000). Cuando se maduraron ovocitos de cerdo en medio NCSU con 10% de FFp y EGF hubo una adecuada expansión de CC y el índice de división embrionaria aumentó en comparación con los medios que no estaban suplementados con estos dos componentes. El suplementar a los medios de maduración con gonadotropinas y suero o FF con EGF incrementó la maduración citoplásmica, que se puede evidenciar por la formación del PNm en ovocitos porcinos, y la capacidad de desarrollo hasta el estado de blastocisto (Abeydeera y col 2000).

2.4. EFECTO DE LAS DIMENSIONES FOLICULARES

La maduración citoplásmica y nuclear, la fertilización y el desarrollo embrionario están influenciadas no solo por el FF, sino también por el tamaño del folículo del cual proviene. Se ha observado que los ovocitos maduros provienen de folículos preovulatorios, en tanto que los ovocitos inmaduros provienen de folículos que tienen un tamaño pequeño.

Cuando se suplementó el medio de maduración con 50% de FFp de folículos de tamaño pequeño (1-2 mm) y mediano (3-5 mm) se inhibió la reanudación de la meiosis de los ovocitos porcinos. La luteinización *in vitro* de las células de la granulosa también se vio afectada por el origen del FFp. Cuando provino de folículos de 1-2 mm tuvo un efecto inhibitorio, los folículos de 3-5 mm presentaron un efecto menor sobre este proceso y el FFp de los de tamaño superior (6-12 mm) permitió su luteinización (Tsafriri y Channing, 1975). Este efecto fue dependiente de la concentración del FFp y fue evaluado en la morfología celular y en la disminución tanto del AMPc como en la secreción de progesterona por parte de las células foliculares. Estos cambios sugirieron que el FFp de folículos pequeños puede contener factores inhibidores de la luteinización y que estos componentes tienden a desaparecer gradualmente a medida que ocurre la maduración del folículo. También se propuso la existencia de sustancias estimuladoras de la luteinización en los folículos de mayor tamaño (Ledwitz-Rigby y col 1977). Por otro lado, hay trabajos en los que se demostró que el FFp de folículos de 2-5 mm en el medio de maduración incrementó la expansión de las CC, la maduración, la fertilización y el desarrollo embrionario (Yoshida y col 1990; Yoshida y col 1992b).

Las células foliculares tienen una función importante en la programación de la maduración del ovocito y su efecto es dependiente del tamaño del folículo. Al realizar cocultivos de COC porcinos con células de folículos de mayor tamaño, se incrementó la maduración citoplásmica y los folículos de menor tamaño fueron menos efectivos, debido a esto, se cree que la heterogeneidad en los folículos en la FIV puede afectar el desarrollo embrionario temprano (Ding y Foxcroft, 1994).

También la concentración de esteroides en el FFp puede variar en función del tamaño del folículo. En cerdas cíclicas y prepúberes estimuladas con eCG, el FFp de folículos grandes mostró una relación similar de progesterona y estradiol, en tanto que el proveniente de folículos pequeños tuvo mayor concentración de testosterona que progesterona y estradiol (Ding y Foxcroft, 1994).

2.5. POLISPERMIA

Además de la baja incidencia en la formación del PNm, otro problema durante la FIV en varias especies es la polispermia, que impide el desarrollo embrionario.

Durante la fertilización, la penetración del espermatozoide en el ovocito induce la exocitosis de los GC (reacción cortical), evitando la polispermia, asegurando la fertilización monospérmica a nivel de la ZP y de la membrana plasmática en los mamíferos (Ducibella, 1996). Sólo aquellos ovocitos que llegaron a la MII tienen la capacidad de llevar a cabo la reacción cortical, sin embargo, la polispermia se presenta con frecuencia en la fertilización de los ovocitos de mamíferos, tanto *in vivo* como *in vitro* (Han y col 1999b). *In vitro*, en el humano se ha reportado 10% de polispermia y en el bovino de 8 a 33% (Gordon, 1994; Han y col 1999a).

En el cerdo, durante la fertilización *in vivo*, el 95% de los ovocitos fertilizados son monospérmicos (Han y col 1999b). Sin embargo, en la FIV se presenta una alta incidencia de polispermia (40-65%). Se ha observado que en los cigotos que presentan polispermia, se puede presentar un patrón anormal en las primeras divisiones embrionarias y tienen un retraso en la formación de los pronúcleos previos a la singamia, en comparación con los ovocitos fertilizados que son diploides. Los ovocitos fertilizados con tres o más pronúcleos pueden llegar al estado de blastocisto. Sin embargo, presentan una masa celular interna con menor número de células que los blastocistos diploides. La mayoría de los blastocistos derivados de ovocitos polispérmicos presentan poliploidías, desarrollándose algunos fetos poliploides con mosaicismo (Han y col 1999b).

ARCHIVO HISTORICO

Es posible que, en porcinos, los procesos de exocitosis y dispersión de los GC sean más lentos que en otras especies como el bovino, por lo que se ha sugerido que la polispermia puede ser el resultado de la falla en la exocitosis de los GC en ovocitos inmaduros, o un retardo de ésta en los ovocitos maduros (Wang y col 1997c). Hasta ahora no se sabe si la polispermia durante la FIV es debida a las condiciones inadecuadas de la maduración o a las condiciones de la fertilización de los ovocitos (Niwa, 1993; Wang y col 1998).

En porcinos existen diversos estudios donde se ha tratado de disminuir la polispermia, algunos autores indican que las condiciones de MIV y FIV son importantes Funahashi y Day. (1993b) Naito y col (1990), utilizaron suplementos como BSA y FFp en los medios de incubación de los espermatozoides y encontraron una disminución en la polispermia, sin afectar la penetración espermática. La presencia del FFp en el medio de prefertilización redujo el número de espermatozoides unidos a la ZP, disminuyendo el índice de polispermia.

Funahashi y Day, (1993b) observaron que el FFp colectado de folículos inmaduros o maduros, incrementó la fertilización monospérmica en ovocitos porcinos fertilizados *in vitro*. Estos mismos autores probaron PVA, FCS, suero de cerdo recién nacido, FFp y fluido seminal porcino como suplementos en el medio de maduración y encontraron que el FFp completo de folículos de 3-6 mm de diámetro fue tan efectivo como el PVA para promover la formación del PNm 18 horas después de la inseminación, en comparación con los demás suplementos (Funahashi y Day, 1993a).

Funahashi y col (1994b), observaron que la incubación de los espermatozoides con FFp al 1% previa a la FIV disminuyó la polispermia e incrementó la capacidad de los ovocitos para llegar a mórula.

En un trabajo para probar el efecto del FF bovino proveniente de folículos pequeños en la FIV y en el desarrollo embrionario, se encontró que el FF al 20% en el medio de FIV redujo la penetración espermática, impidiendo la polispermia pero no mejoró el desarrollo embrionario, disminuyendo la proporción de desarrollo de los blastocistos que eclosionaron. Esto pudo deberse a que el FF

provino de folículos pequeños (Choi y col 1998). Se ha logrado aumentar la proporción de ovocitos monospermicos y la formación de dos pronúcleos normales al suplementar los medios de maduración con el EGF solo, o en combinación con IGF-I (Illera y col 1998).

Al suplementar los medios de MIV y FIV con FFp fresco o congelado y/o con medio condicionado, en compañía de células de oviducto de cerdas próximas a la ovulación, se obtuvo una fertilización normal y una disminución de la polispermia en un 34%, al inseminar ovocitos obtenidos de folículos tanto pequeños como medianos (Vatzias y Hagen, 1999).

Se han variado las concentraciones de espermatozoides para la inseminación de los ovocitos; al inseminar con cien mil células/ml se obtuvo un 40% de penetración espermática y 16% de polispermia. Sin embargo, el índice de polispermia aumentó en relación directa al tiempo de coincubación, habiendo diferencias entre las 3 y las 9 horas. Se han adicionado al medio de FIV diferentes concentraciones de bicarbonato de sodio y con la concentración de 46 mM se obtuvo una penetración del 84% y una disminución en la polispermia del 39% (Abeydeera y Day, 1997; Abeydeera y col 1997).

Las células del oviducto juegan un papel muy importante en la fertilización *in vivo*, se cree que seleccionan a poblaciones de espermatozoides con alta capacidad fertilizante. Al cocultivar estas células con espermatozoides durante la FIV, fue posible reducir el número de espermatozoides que entraron en contacto con el ovocito, reduciendo así el índice de polispermia (Dubuc y Sirard, 1995).

Al utilizar FFp congelado–descongelado, proveniente de folículos medianos (5.1-7 mm) en los medios de MIV y FIV, se ha observado un incremento en la maduración nuclear y citoplásmica en el ovocito aumentando la penetración, induciendo la descondensación del espermatozoide y la formación del PNm, disminuyendo la incidencia de polispermia y favoreciendo el desarrollo embrionario (Vatzias y Hagen, 1999).

Aunque se ha logrado reducir parcialmente la polispermia, los resultados no son reproducibles y se requiere implementar estrategias más adecuadas que

permitan reducirla y de ser posible eliminarla. El FFp es un componente muy importante en los medios de maduración ya que existen reportes en donde incrementa la maduración nuclear y citoplásmica y reduce la polispermia. El empleo del FFp permitiría aumentar la producción de embriones viables que puedan ser transferidos y de esta forma incrementar el número de nacimientos.

3. JUSTIFICACIÓN

El modelo porcino ha cobrado gran importancia para realizar estudios biomédicos debido a que presenta similitudes con el humano desde los puntos de vista anatómico, fisiológico y bioquímico, por lo que constituye un modelo conveniente para estudiar procesos que pueden ser extrapolados al humano. Además, existe un gran interés en la producción de cerdos transgénicos ya que pueden constituir una fuente importante para la obtención de productos biofarmacéuticos. El interés de crear cerdos modificados genéticamente ha aumentado por la posibilidad de que en el futuro, puedan ser utilizados como donadores de órganos para realizar xenotransplantes.

Para llevar a cabo estudios de transgénesis ya sea microinyección al pronúcleo, clonación, transferencia genética retroviral, transgénesis por medio de espermatozoides o transgénesis por medio de células tallo embrionarias, se requiere la producción de una gran cantidad de ovocitos maduros, de cigotos y de embriones en estado temprano de desarrollo donde puedan aplicarse estas metodologías. Para lograrlo, es fundamental contar con medios de maduración que permitan a los ovocitos alcanzar una maduración nuclear y citoplásmica completa para contar con ovocitos competentes que puedan ser fertilizados, enucleados y/o microinyectados. De esta forma se podrían producir embriones de calidad para emplearlos en investigación o en programas de transferencia embrionaria. Estos embriones transgénicos nacerán y se desarrollarán para producir los productos específicos dependiendo la finalidad para la que hayan sido concebidos.

En el folículo ovárico el FF constituye un microambiente en el que se nutre el ovocito, reanuda la división meiótica y se lleva a cabo la maduración nuclear y citoplásmica. El FF contiene factores fisiológicos y bioquímicos que desempeñan un papel importante en la maduración nuclear, en la maduración citoplásmica, formación del pronúcleo y en el desarrollo embrionario.

Uno de los problemas más graves en la FIV es la polispermia, que provoca poliploidías, anormalidades en la división del embrión que conduce a muerte embrionaria, se sabe que el FFp también puede tener un efecto en la reducción de la polispermia.

Los factores contenidos en el FFp pueden actuar sinérgicamente con el EGF y las gonadotropinas para estimular la expansión de las células del cúmulo y contribuir a la maduración. Sin embargo, se ha reportado que el FFp tiene factores que pueden ejercer efecto inhibitorio en la reanudación de la meiosis. El tamaño del folículo del que proceden los ovocitos y el FFp pueden influir para que los ovocitos permanezcan en etapa de VG o que alcancen la maduración nuclear y citoplásmica para el desarrollo del PNm después de la fertilización.

Por lo anterior, al estudiar el efecto que tengan sobre la maduración, la fertilización y la polispermia el fluido folicular o sus fracciones, adicionadas en el medio de maduración, permitirá que se puedan diseñar medios definidos eficientes que incrementen la eficacia de la FIV y de las técnicas asociadas a ésta.

4. HIPÓTESIS

El FFp contiene componentes de diferente naturaleza química que regulan la maduración de los ovocitos dependiendo del tamaño del folículo.

Las hipótesis de trabajo son las siguientes:

El FFp proveniente de folículos de tamaño pequeño inhibirá la MIV y FIV y el proveniente de folículos grandes tendrá un efecto positivo sobre estos procesos y reducirá la polispermia.

El FFp tiene proteínas que al separarse de acuerdo a su punto isoeléctrico al pasar por una columna de intercambio iónico, producirá fracciones que afectarán la MIV, FIV y polispermia. Algunas fracciones proteínicas en el medio de maduración promoverán la maduración nuclear y citoplásmica y otras tendrán un efecto inhibitorio. Algunas de ellas disminuirán la polispermia.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto del FFp empleado como suplemento en el medio de maduración sobre la MIV, FIV y polispermia de ovocitos porcinos.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener FFp proveniente de folículos mayores y menores de 5 mm de diámetro y comparar su efecto en la MIV, FIV y polispermia.
- Fraccionar el FFp por medio de cromatografía de intercambio iónico por columna de aminas cuaternarias.
- Determinar por medio de la técnica de Lowry la concentración de proteínas de las fracciones obtenidas.
- Determinar el efecto que pueden tener las fracciones del FFp en el medio de maduración sobre la MIV, FIV y polispermia.
- Analizar por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS las fracciones proteínicas. Hipotetizar, tomando en cuenta el patrón de bandas, si alguna de estas últimas pudiera tener efecto en los procesos de MIV, FIV y polispermia.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. COLECCIÓN DEL FFp

El fluido folicular porcino (FFp) se obtuvo de ovarios de cerdas prepúberes sacrificadas en el rastro (Los Arcos, Edo. de México). Los ovarios fueron transportados en un tiempo no mayor de 2 horas en una solución salina de NaCl al 0.9% con 75 µg/ml de penicilina G y 50 µg/ml de estreptomicina a 25-30°C. En el laboratorio se enjuagaron por lo menos tres veces en solución salina. Se seleccionaron los folículos ováricos y se clasificaron en dos categorías:

Pequeños: menores de 5 mm (FFp1)

Grandes: mayores de 5 mm (5.1-8 mm) (FFp2)

El FFp de cada categoría de folículo se colectó mediante la punción con una aguja hipodérmica de 18 x 38 mm unida a una jeringa de 10 ml (Becton Dickinson, México). El FFp se depositó en un tubo de centrifuga de 50 ml (Nunc, Dinamarca) y se dejó reposar sobre hielo de 15 a 30 minutos para sedimentar el paquete celular. Se tomó el FFp con una jeringa, se depositó en un tubo de centrifuga de poliestireno de 110 x 16 mm (Nunc, Dinamarca) y se centrifugó a 1500 x g durante 30 min a 4 °C (Beckman, Irving CA, EUA) para eliminar los restos celulares. Posteriormente, se filtró a través de membranas de 1.2, 0.8 y 0.45 µm tipo HA (Millipore, Bedford MA, EUA) y finalmente se pasó a través de una unidad de filtración de 0.22 µm Millex GV (Millipore, Bedford MA, EUA) para esterilizarlo. El FFp se almacenó en nitrógeno líquido hasta su utilización en la maduración de los ovocitos.

6.2. MADURACIÓN Y FERTILIZACIÓN IN VITRO

Las técnicas de MIV y FIV de ovocitos porcinos y la preparación de los medios de cultivo se realizaron de acuerdo con los trabajos realizados por Abeydeera y col (1998d).

A menos de que se especifique lo contrario, todos los reactivos fueron de la marca Sigma (Sigma Chemical Company, St Louis, MO EUA). Los reactivos y las soluciones se esterilizaron mediante filtración con membranas de 0.22 μm Millex-GV.

Todas las técnicas se realizaron bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar (Veco, México) y todos los procedimientos de incubación se llevaron a cabo a 39°C con 5% de CO₂, 95% de aire y humedad a saturación (Bellco Biotechnology, Veneland, NJ EUA.). Todos los procedimientos de MIV y FIV se realizaron en recipientes cubiertos con aceite mineral (Fisher Scientific, PA EUA).

Los medios empleados, después de su preparación se conservaron a 4°C y se usaron en no más de 21 días. A menos de que se especifiquen otras condiciones, los medios se suplementaron 24 horas antes del cultivo y se preincubaron en las condiciones antes mencionadas.

6.2.1. Maduración de ovocitos *in vitro*

Colección de los Complejos Ovocitos-Células del Cúmulo

La colección de los ovarios para la obtención de los ovocitos se realizó como se indica en la sección 6.1. Los folículos se puncionaron seleccionando los de diámetro de 3 a 6 mm para la obtención del FFp, en el que se encuentran los COC, éste se colocó en un tubo de 50 ml y se dejó sedimentar durante 15 a 20 minutos.

El sobrenadante se desechó y el paquete celular se lavó dos veces con medio modificado de Tyrode suplementado con lactato de sodio, HEPES y PVA (Anexo) con un pH de 7.3 a 7.4. Se depositó en una caja de Petri de 90 mm de diámetro (S y M Laboratorios, México) con 20 ml del mismo medio.

Bajo un microscopio estereoscópico (Olympus SZ60, Olympus Optical, Japón) se aspiraron los COC con una pipeta Pasteur estéril de 9 pulgadas, adelgazada por calor en forma manual con la que se hizo una micropipeta de tal manera que pudieran pasar a través de ella los COC sin dañarse. Se eligieron

aquellos ovocitos que presentaron el citoplasma uniforme y estuvieran rodeados por una masa completa y uniforme de células del cúmulo.

La maduración de los COC se llevó a cabo en medio para maduración de ovocitos libre de proteínas, preparado con medio TCM 199 con sales de Earle y bicarbonato de sodio (In vitro, México) suplementado con PVA al 0.1%, D-glucosa 3.05 mM, piruvato de sodio 0.91 mM, cisteína 0.57 mM y EGF 10 ng/ml (Wang y Niwa, 1995). (Anexo)

Los ovocitos seleccionados se lavaron 3 veces en una caja de Petri estéril de 35 mm de diámetro (Nunc, Dinamarca), que contenía una gota de 500 μ l de medio de maduración. En una caja estéril de 4 pozos (Nunc, Dinamarca) se depositaron de 40 a 50 COC por cada pozo en una gota de 500 μ l de medio de maduración. Inmediatamente antes de la incubación se agregaron 13 μ l de Pergonal 75 UI (Gonadotropinas postmenopáusicas humanas, FSH y LH) (Serono, México). Las cajas se incubaron durante 44 horas.

Denudación de los ovocitos

Transcurrido el tiempo de maduración, se agregaron a cada pozo 300 μ l de hialuronidasa al 0.1 % preparada en TCM-199 sin suplementos, para eliminar las células del cúmulo. Los ovocitos fueron denudados mecánicamente utilizando una pipeta Pasteur adelgazada manualmente, con el diámetro adecuado para no dañar al ovocito. Posteriormente se lavaron para quitar el exceso de la enzima en 2 gotas de 500 μ l de medio de maduración TCM 199 sin suplementos, en cajas de Petri de 35 mm de diámetro.

Los ovocitos se pasaron sucesivamente a 3 gotas de 500 μ l de medio amortiguado con Tris modificado (TBMm) (Anexo). Este medio fue suplementado con cafeína 2.5 mM y BSA fracción V al 4%, 48 horas antes de la fertilización y se preincubó en las condiciones descritas.

En una caja de 4 pozos, se depositó una gota de 50 μ l de TBMm suplementado. Se preincubó 24 horas antes de la fertilización, para depositar de 35 a 40 ovocitos por pozo media hora antes de la inseminación.

Obtención y preparación del semen

El semen se colectó en una granja porcina comercial de machos adultos con fertilidad comprobada. Se utilizó la técnica de la mano enguantada, separando la fracción gelatinosa y se transportó al laboratorio en menos de 1 hora a 37°C. El eyaculado fue diluido con extensor de Reading, en forma isotérmica a 30°C (Revell y Glossop, 1989) y conservado a 16° C por 24 horas. Antes de realizar la dilución del semen se verificó la movilidad espermática a 250X en un microscopio invertido (Olympus M021, Olympus Optical, Japón). Se verificó que las muestras utilizadas para la FIV presentaran como mínimo el 80% de movilidad.

Cinco ml de semen se diluyeron en 5 ml de solución amortiguadora de fosfatos de Dulbecco (DPBS) (Gibco BRL, NY EUA), suplementada con 1g de Ca Cl₂ /l, BSA fracción V al 0.1%, a un pH de 7.2 a 7.4, a 39 °C (Anexo) y se centrifugaron a 61 g durante 5 min en una centrifuga clínica (Jouan, Francia). Cinco ml del sobrenadante, se mezclaron con 5 ml de DPBS y se centrifugaron a 1900 g por 5 min. Se desechó el sobrenadante, el paquete celular se resuspendió con 10 ml de DPBS y se centrifugó a la misma velocidad dos veces más. Finalmente, el paquete celular se diluyó en 100 µl de TBMm. Después de cada lavado se verificó la movilidad espermática para asegurarse de que se mantuviera al menos en un 70%.

La concentración espermática se determinó realizando una dilución 1:1000 con agua. El conteo de los espermatozoides se llevó a cabo observando al microscopio de contraste de fases (Carl Zeiss, Alemania) a 250X utilizando una Cámara de Neubauer (Blau Brand, Alemania).

6.2.2. Fertilización *in vitro*

Después del conteo espermático, se tomó la cantidad necesaria del paquete celular contenida en los 100 µl de TBMm y se diluyó nuevamente en ese medio para que la gota de FIV tuviera una concentración final de 5×10^5 espermatozoides/ml. Para tener esa concentración, se agregaron 50 µl de la suspensión de espermatozoides a las gotas de 50 µl del medio de fertilización en

la caja de 4 pozos, con 35 a 40 ovocitos (Abeydeera y col 1998c; Abeydeera y col 1998d). La coincubación se llevó a cabo durante 7 horas.

Lavado de los ovocitos y transferencia al medio de desarrollo embrionario

Transcurrido el tiempo de coincubación, se procedió a eliminar el exceso de espermatozoides. Para esto, los ovocitos se transfirieron a cajas de Petri de 35 mm de diámetro y se lavaron 3 veces en gotas de 50 μ l de medio de desarrollo embrionario NCSU-23 (North Carolina State University) (Anexo) (Petters y Wells, 1993) suplementado con 0.4% de BSA libre de ácidos grasos. Posteriormente se transfirieron a gotas de 500 μ l del mismo medio cubiertas con aceite mineral en cajas de 4 pozos y se incubaron 14 horas.

Fijación, tinción y evaluación de los ovocitos

Catorce horas después de haber sido transferidos al medio de desarrollo de embriones, los ovocitos se lavaron 3 veces en gotas de 100 μ l con medio TL-Hepes-PVA modificado. Con una pipeta Pasteur adelgazada manualmente y bajo el microscopio estereoscópico. Se tomaron de 15 a 20 ovocitos y se depositaron en un portaobjetos (Fisher Scientific, PA EUA). Con un cubreobjetos de 22x22-2 (Fisher Scientific, PA EUA) se presionaron los ovocitos sobre el portaobjetos hasta inmovilizarlos. Posteriormente, cada preparación se fijó en una solución de etanol: ácido acético (J.T Baker, México) (3:1 v/v) durante 72 horas.

Transcurrido ese tiempo, los ovocitos fueron teñidos con una solución de orceína al 0.1% preparada en ácido acético glacial al 45 % y para aclarar el fondo de la preparación se agregó una solución de glicerina: ácido acético: agua (1:1:3) (J.T. Baker, México) (Abeydeera y col 1998d).

La evaluación de la maduración y fertilización de los ovocitos se llevó a cabo utilizando un microscopio de contraste de fases a 400 aumentos (Olympus CX 31, Olympus Optical, Japón). Los ovocitos se clasificaron de acuerdo a los siguientes criterios (Abeydeera y col 1998d; Hunter y Polge, 1966; Vatzias y Hagen, 1999):

- **Inmaduros:** los ovocitos que mostraron vesícula germinal (VG).
- **En vías de maduración:** los que presentaron cromosomas en Metafase I (MI).
- **Maduros:** los ovocitos que presentaron cromosomas en Metafase II (MII) y el primer cuerpo polar estuvieran o no fertilizados
- **Monospermicos:** los ovocitos fertilizados que presentaron los pronúcleos masculino y femenino.
- **Polispermicos:** los ovocitos fertilizados que presentaron más de dos pronúcleos.

Los resultados se analizaron utilizando las siguientes relaciones:

Calidad de ovocitos	Relación
Inmaduros	Ovocitos con VG/Total de ovocitos.
En vías de maduración	Ovocitos en MI/Total de ovocitos.
Madurados	Suma de ovocitos en MII + Fertilizados/ Total de ovocitos.
Fertilizados	Ovocitos con 2 o más pronúcleos / Total de ovocitos.
Eficiencia de la fertilización	Ovocitos fertilizados/Total de ovocitos madurados
Polispermia	Ovocitos polispermicos/ovocitos fertilizados

6.3. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DEL FLUIDO FOLICULAR

6.3.1. Cuantificación de proteínas

Para cuantificar la concentración de proteínas del FF y las regiones se llevó a cabo la técnica de Lowry (Lowry, 1951).

Se elaboró una curva patrón con BSA (10 mg/ml). En el caso del FF se hicieron diluciones 1:500 y para las 5 regiones del FF se realizaron diluciones de 1:100, se llevó a un volumen total de 200 μ l, se agregaron 20 μ l de dioxicolato de sodio al 15%, se agitó y se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente y se añadieron 20 μ l de ácido tricloracético al 72% p/v. Las muestras se centrifugaron a 3000 g durante 15 minutos y el paquete se disolvió en 200 μ l de agua. Se preparó una solución stock de cobre/tartrato/carbonato (CTC) ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.2% p/v, tartrato de potasio al 0.2% p/v y carbonato de sodio al 20%). Se agregaron 200 μ l de la solución de trabajo CTC (preparada con volúmenes iguales de la solución stock de CTC, 0.8 M de Na OH, y de SDS al 10% p/v). Se agitó y se dejó sedimentar 10 minutos. Se añadieron 100 μ l de reactivo de Folin al 20 %. Las muestras se leyeron en el espectrofotómetro (Thermo Spectronic Biomaster, Rochester, NY EUA) a una longitud de onda de 750 nm (Stoscheck, 1990).

6.3.2. Cromatografía de intercambio aniónico de proteínas

El fraccionamiento del FFp1 se realizó por medio de cromatografía líquida rápida de proteínas (González, 1997) en un cromatógrafo de líquidos (Biologic System, Bio-Rad, Hercules, CA EUA) utilizando una columna de aminas cuaternarias BioScale Q 5 (BioRad). Las condiciones de separación se manejaron a través del programa Biologic v.130 (Bio-Rad).

Cuadro 2. Protocolo del fraccionamiento de la cromatografía de intercambio aniónico.

Pasos del protocolo	ml
%B = 0	5.0
Inyección de 10mg/ml de muestra	5-6
% B = 0	6-11
Gradiente lineal %B de 0 a 35 (35 minutos)	11-46
%B = 35	46-51
%B = 100	51-56
%B = 0	56-62

El equipo se lavó con una solución de TRIS 50 mM a pH 7.5 (solución A), con un flujo de 1 ml /min durante 10 minutos. Posteriormente, se pasó una solución de TRIS 50 mM con NaCl 1 M a pH 7.5 (solución B) con el mismo flujo durante 10 minutos. Se pasó la solución A durante 20 minutos para equilibrar la columna y se procedió a hacer la inyección del FFP1. Se inyectaron 10mg/ml de cada una de las muestras de acuerdo al protocolo indicado.

Se colectaron fracciones de 0.5 ml que se agruparon para su análisis, en cinco superfracciones a las que se les denominó "Regiones" como lo indica el Cuadro 5. Las regiones se dializaron por separado en membranas Spectrapore (Spectrum, Medical Ind. Houston, TX EUA) con sello de 12-14 kDa contra 1 l de agua desionizada con 5 cambios de agua durante 24 h en refrigeración y finalmente se liofilizaron (Labconco Mod 75250, Kansas City, MO EUA).

Cada una de las regiones se llevó a un volumen igual al original del FFP del que fue procesado con medio TCM-199 y se filtraron a través de una unidad de filtración de 0.22 µm para esterilizarlas. Se hicieron alícuotas de 2 ml y se

guardaron en un ultracongelador (ScienTemp, Adrian, MI EUA) a una temperatura de -80°C hasta su uso.

6.3.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS)

Las regiones se analizaron mediante una electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida en presencia de SDS en medio reductor (PAGE-SDS) (Laemmli, 1970).

Las proteínas de las regiones se precipitaron con 4 volúmenes de acetona helada, se incubaron en hielo durante 30 minutos y se centrifugaron a 14000 x g durante 10 minutos en una microcentrífuga (5415C, Eppendorf, Alemania). El sobrenadante se desechó y el paquete se dejó secar. Se agregaron 22 µl de solución amortiguadora de muestra (Tris 0.5 M a pH 6.8, SDS 10%, Glicerol, Azul de Bromofenol 0.5% y β-mercaptoetanol 5%). Las muestras se calentaron a 100°C por 3 minutos.

Para la electroforesis se preparó un gel de separación de 10% y un gel de compactación al 4% con Acrilamida/Bis 30% Solución, 37.5:1 (2.6%C).

Se colocaron 20 µg de proteína en cada carril. La separación se realizó en una cámara de electroforesis (Mini-PROTEAN II Cell Bio-Rad) a 200 volts durante 45 minutos. La solución amortiguadora de electrodo se preparó con Tris 0.025 M glicina 0.192 M, y SDS al 0.1% (p/v) a pH de 8.3 (Garfin, 1990).

Tinción con azul de Coomassie

El gel de poliacrilamida se fijó con una solución de metanol-ácido acético-agua (50:10:40) durante una hora en agitación suave. Posteriormente, el gel se introdujo en una solución de azul de Coomassie R-250 (J.T. Baker México) al 0.1% preparada en metanol-ácido acético (40:10) y se mantuvo durante una hora en agitación suave. El gel se decoloró en una solución metanol-ácido acético-agua (30:7.5:62.5) (Garfin, 1990).

Análisis del gel por medio de densitometría

El gel se digitalizó con un scanner y el análisis se realizó por medio de densitometría con el software Labworks 4.0 de upv (Imaging Systems.Inc EUA). La M_r (masa relativa) de las bandas se determinó comparándolas con la M_r de un estándar de bajo peso molecular (Bio-Rad).

6.4. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

En condiciones ideales de MIV los porcentajes de ovocitos en VG y en MI descenden al mínimo, y el número de ovocitos en MII alcanza el máximo, esto significa que los ovocitos tienen una maduración nuclear ideal ($MII > MI \geq VG$).

Si las condiciones de maduración nuclear y citoplásmica son ideales, en la FIV la mayor parte de ovocitos que están en MII deben estar penetrados y presentar un pronúcleo masculino y uno femenino ($F > MII$) lo que indica que las condiciones de fertilización son adecuadas. Además, se espera que no haya polispermia o que se presente en porcentajes muy bajos.

Se consideró la diferencia como significativa cuando $p < 0.05$.

Todos los resultados se analizaron por la prueba de X^2 (Castilla y Cravioto, 1991).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Efecto del FFp de folículos de diferente tamaño en la maduración, fertilización y polispermia

7.1.1. RESULTADOS

OBTENCIÓN DEL FFp

Se puncionaron 130 ovarios obteniéndose un volumen de aproximadamente 50 ml de FFp1 y 50 ml de FFp2. Tuvieron una concentración de proteína de 63 y 62 mg/ml respectivamente.

MADURACIÓN DE OVOCITOS EN PRESENCIA DE FFp DE FOLICULOS MAYORES Y MENORES DE 5 mm

Para probar el efecto del FFp proveniente de los dos tamaños foliculares se formaron cuatro grupos:

- a) Testigo negativo. Sin suplementos hormonales: LH, FSH, EGF (SSH).
- b) Testigo positivo. Con suplementos hormonales: LH, FSH, EGF (CSH).
- c) Con LH, FSH, EGF + 10% FFp1.
- d) Con LH, FSH, EGF + 10% FFp2.

El FFp se empleó al 10% como se indica en varios de los protocolos de MIV en porcino (Abeydeera y col 1998d; Funahashi y Day, 1993a; Funahashi y col 1994a; Vatzias y Hagen, 1999; Yoon y col 2000).

Análisis de los COC madurados en presencia de FFp

Después de 44 horas de maduración, se evaluaron los COC. En la Figura 1 se presenta una imagen con COC madurados con FFp. En la Figura 1, a y b se

muestran los grupos testigo SSH y CSH respectivamente. Con los dos tipos de FFp se presentó mayor expansión de las CC (Figura 1, c y d).

Se analizaron 1032 ovocitos: 133 en el grupo SSH, 253 en el grupo CSH, 310 en el grupo FFp1 y 336 en el FFp2. En el Cuadro 3 se muestran los porcentajes de maduración, fertilización y polispermia en los cuatro grupos analizados a partir del número de ovocitos en cada estado de maduración o fertilización entre el número total.

Debido a la variabilidad de los datos en los diferentes ensayos, los promedios obtenidos en el Cuadro 3 se normalizaron. Los valores del testigo negativo (SSH), que corresponde a los ovocitos con maduración espontánea, se tomaron como el 100% (Cuadro 4).

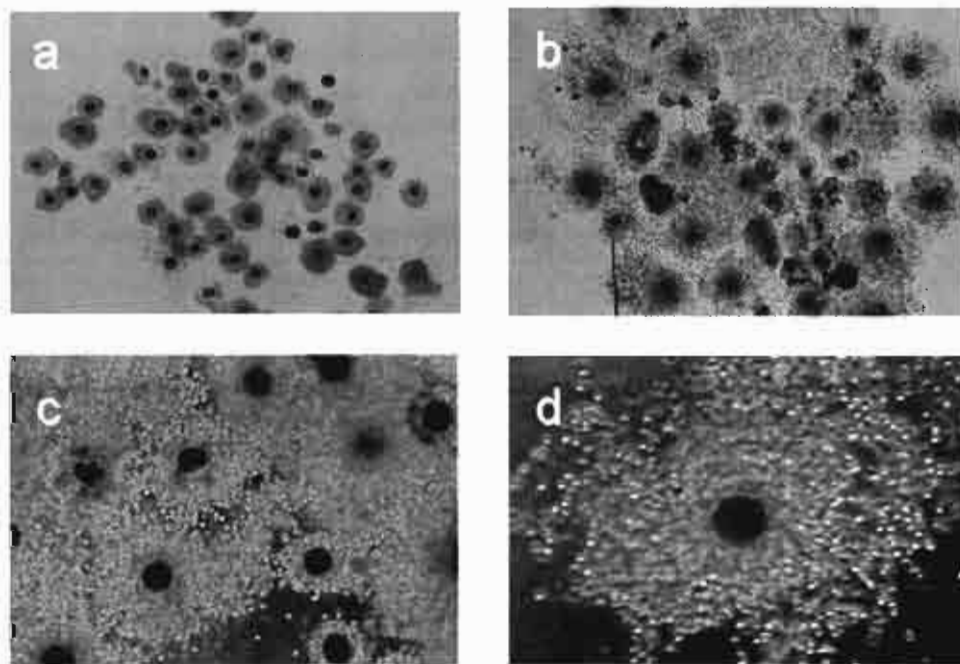


Figura 1. Complejo ovocitos-células del cúmulo madurado *in vitro*. a, sin gonadotropinas ni EGF (100X); b, con gonadotropinas y EGF (100X); c, con FFp más gonadotropinas y EGF (200X); d, aumento de un ovocito madurado con FFp (400X).

Cuadro 3. Porcentajes de maduración, fertilización y polispermia en ovocitos cultivados en medio de MIV con FFp de folículos de diferente tamaño.

Tratamiento	N	VG	MI	MII	Fertilizados (PNm)	Eficiencia de fertilización
SSH	133	42 (56/133)	11 (14/133)	47 (63/133)	14 (18/133)	20.9%
CSH	253	13 (32/253)	19 (48/253)	68 (173/253)	43 (109/253)	24.9%
FFp1	310	9 (29/310)	5 (15/310)	86 (266/310)	66 (205/310)	21.3%
FFp2	336	8 (28/336)	7 (22/336)	85 (286/336)	70 (234/336)	23.8%

Porcentaje (número de ovocitos/número total).

VG: ovocitos inmaduros con vesícula germinal; MI: ovocitos en metafase I que están en vías de maduración; MII: ovocitos en metafase II; PNm: ovocitos fertilizados con pronúcleo masculino (PNm); eficiencia de la fertilización: ovocitos fertilizados /madurados.

Cuadro 4. Porcentajes normalizados de maduración, fertilización y polispermia en ovocitos cultivados con diferentes suplementos. El grupo SSH se tomó como el testigo negativo.

Tratamiento	VG	M I	M II	Fertilizados (PNm)	Eficiencia de fertilización
SSH	100	100	100	100	100
CSH	31 ^a	173 ^a	145 ^a	307 ^a	217 ^a
FFp1	21 ^{ab}	45 ^{ab}	183 ^{ab}	471 ^{ab}	265 ^a
FFp2	19 ^{ab}	64 ^{abc}	181 ^{ab}	500 ^{ab}	283 ^a

a diferente a SSH, b diferente a CSH, c diferente a FFp1 (p < 0.05).

VG: ovocitos inmaduros con vesícula germinal; M I: ovocitos en metafase I que están en vías de maduración; M II: ovocitos en metafase II; PNm: ovocitos fertilizados con pronúcleo masculino; eficiencia de la fertilización: ovocitos fertilizados / madurados.

A continuación se describen los resultados de cada etapa del proceso de maduración, fertilización y polispermia.

Maduración de ovocitos

Presencia de Vesícula Germinal

El grupo CSH presentó una disminución del 69% de ovocitos inmaduros en relación al grupo SSH y en los dos grupos de FFp la disminución fue del 80%, lo que indica la reanudación de la meiosis de los ovocitos en estos tres grupos. Cuando se comparó el grupo CSH contra FFp1 y FFp2, se observó una disminución de ovocitos inmaduros de 30 y 40%, respectivamente, lo que significa que la presencia del FFp tiene un efecto benéfico en el rompimiento de la VG. No hubo diferencia entre los dos grupos de FFp (Cuadro 4, Figura 2).

Metafase I

En comparación con el SSH, el grupo de ovocitos CSH que llegaron a MI aumentó un 73%, lo que indica que las gonadotropinas y EGF promueven el rompimiento de la VG y el inicio de la maduración. El FFp1 y FFp2 disminuyeron 55 y 36%, respectivamente. En relación al grupo CSH, el FFp1 disminuyó 74% y el FFp2 63%. La disminución de los porcentajes de los ovocitos en MI con respecto al SSH y CSH significa que el FFp promueve que los ovocitos avancen hacia la MII. Al comparar el efecto entre los dos FFp, el FFp2 aumentó 40% en comparación con el FFp1 (Cuadro 4, Figura 2).

Metafase II

Los ovocitos del grupo CSH, tuvieron un incremento del 45% en el porcentaje de ovocitos en MII en comparación con el grupo SSH lo que significa que las gonadotropinas y el EGF son importantes para la maduración nuclear. El FFp1 y FFp2 incrementaron significativamente los porcentajes de MII (83 y 81%). Además, los dos grupos tuvieron un incremento del 25% en el porcentaje de ovocitos en MII con respecto al grupo CSH, lo que indica que el FFp más las gonadotropinas tiene un

efecto sinérgico e incrementa la maduración nuclear de los ovocitos de manera más rápida que cuando sólo están presentes estas hormonas. Entre los dos grupos de FFp no hubo diferencia (Cuadro 4, Figura 2).

Fertilización y polispermia

Fertilización

Los ovocitos fertilizados con respecto al número total mostraron que el grupo CSH aumentó el 207% con respecto al grupo SSH, en tanto que los grupos FFp1 y FFp2 tuvieron un incremento del 371 y 400%, respectivamente. En comparación con el grupo CSH, el FFp1 aumentó un 53% y el FFp2 un 63%. Entre los dos grupos de FFp no hubo diferencia significativa (Cuadro 4, Figura 2). Estos resultados confirman el efecto positivo de las gonadotropinas en la maduración citoplásmica, además, la presencia del FFp en el medio de maduración tuvo un efecto de incremento.

La eficiencia de la fertilización (F/M), presentó una tendencia igual a la descrita anteriormente. Los ovocitos de los grupos CSH, FFp1 y FFp2 tuvieron un incremento del 117%, 165 y 183% respectivamente, con relación al grupo SSH. Los porcentajes de fertilización en los grupos FFp1 y FFp2 también se incrementaron 22 y 30% en comparación con el grupo CSH, y entre ellos no hubo diferencia significativa. (Cuadro 4, Figura 2).

Polispermia

En relación a la fertilización polispermica, se observó que los grupos FFp1 y FFp2 presentaron un aumento significativo del 57 y 35 % con respecto al grupo SSH, y del 47 y 27%, respectivamente, en relación al grupo CSH, lo que indica que el FFp junto con las gonadotropinas al aumentar la fertilización incrementa también la polispermia. No hubo diferencia entre los dos tipos de FFp (Cuadro 4, Figura 2).

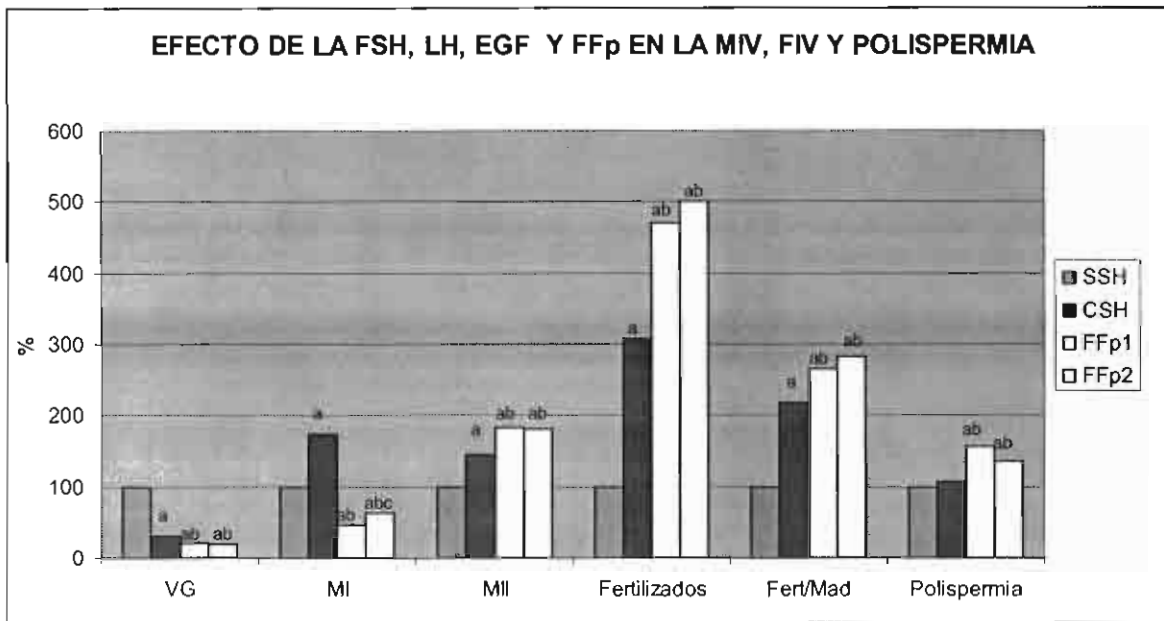


Figura 2: Efecto de la FSH, LH y EGF (CSH), del FFp1 y FFp2 en los medios de MIV sobre la maduración, fertilización y polispermia. SSH se normalizó al 100%.

a diferente a SSH, b diferente a CSH, c diferente a FFp1 ($p < 0.05$).

7.1.2. DISCUSIÓN

Efecto de las gonadotropinas y el EGF en la maduración

Maduración nuclear

El hecho de que en el grupo CSH la presencia de ovocitos con VG haya disminuido, significa que las gonadotropinas y el EGF tuvieron un efecto positivo en la reanudación de la meiosis, permitiendo que los ovocitos llegaran a la MI.

El porcentaje de ovocitos que prosiguieron a la MII en el grupo CSH, tuvo un descenso en comparación con los ovocitos en MI lo que puede deberse a que una población de ovocitos no respondió al estímulo de las hormonas gonadotrópicas y permaneció en MI, en tanto que otra población de ovocitos, además de alcanzar la

maduración nuclear, alcanzó la citoplásmica y fue fertilizada. Como era de esperarse, lo anterior indica que las gonadotropinas y el EGF tienen una función importante al favorecer la maduración y la fertilización. Estos resultados coinciden con los de otras investigaciones que han descrito la importancia de las gonadotropinas y del EGF en la estimulación del proceso meiótico en porcinos (Ding y Foxcroft, 1994; Mattioli y col 1991; Naito y col 1990), ratones, ratas, ovinos y bovinos (Moor y Trounson, 1977).

En los modelos *in vitro*, con células de rata y ratón, se ha demostrado que hay moléculas inhibitoras de la meiosis como el AMPc que pasan al ovocito a través de las CC. La detención meiótica es mantenida por las uniones de comunicación entre estas células y el ovocito. Antes de la ovulación, cuando se elevan las concentraciones de gonadotropinas, especialmente LH, ocurre el desacoplamiento de estas células con el ovocito. En porcinos, la LH y la FSH en forma separada o en combinación, aceleran el proceso de reanudación de la meiosis, induciendo el progreso de los ovocitos de la Profase I hacia MII (Mattioli y col 1991). La LH neutraliza la acción de los inhibidores de la maduración promoviendo la luteinización de las células de la granulosa, lo que resulta en la suspensión de la síntesis de factores inhibitorios, y la GnRH activa el mecanismo de liberación de calcio inducido por el inositol trifosfato (IP₃) (Chi y col 1998). El proceso de reanudación de la meiosis también está relacionado con el Factor Promotor de la Maduración (Casas y col 1999; Eppig, 1993).

El EGF, es un péptido de 6 kDa, que llega al FF a través de la barrera sanguínea folicular y estimula la producción de progesterona, participa en procesos que dependen de la FSH y estimula a las células de la granulosa a producir la proteína de unión para el IGF-I que promueve la maduración folicular así como la diferenciación de las células de la granulosa, y aumenta el efecto esteroideogénico de la FSH (Spitzer y col 1996). Por esto, la presencia de este factor en el medio de MIV con gonadotropinas, favoreció la maduración de los ovocitos.

Maduración citoplásmica y fertilización

La maduración citoplásmica se evaluó por el desarrollo del PNm en los ovocitos después de la fertilización. Cuando las gonadotropinas estuvieron presentes, se triplicó el porcentaje de ovocitos con PNm con respecto al testigo negativo (SSH). Así mismo, la disminución en los porcentajes de ovocitos en MII se explica por el incremento de ovocitos que fueron fertilizados y presentaron PNm.

Cuando se evaluó la eficiencia de fertilización (F/M), que refleja la capacidad de los ovocitos madurados a ser fertilizados, se observó esta misma tendencia ya que el grupo CSH duplicó el porcentaje de ovocitos fertilizados en comparación con el grupo SSH. Esto indica que las gonadotropinas en el medio de maduración, aparte de incrementar el porcentaje de maduración nuclear favorecieron la maduración citoplásmica, y la eficiencia de la fertilización. Estos resultados coinciden con los de Eppig (1993), en los que los ovocitos madurados *in vitro*, en presencia de gonadotropinas y EGF presentaron mayor maduración y fertilización, que los ovocitos que maduraron sin suplementos hormonales, indicando que dichas hormonas tienen un papel fundamental para que el ovocito alcance la maduración y se lleve a cabo la formación de PNm.

En forma similar, en ovocitos porcinos, el suplementar los medios de MIV con gonadotropinas y suero, o FFp con EGF mejoró la maduración citoplásmica, evidenciada por la formación del PNm y el desarrollo de embriones hasta el estado de blastocisto (Abeydeera y col 2000). En programas de FIV en humanos, la presencia de FSH y LH en los medios de maduración incrementa la competencia del ovocito, lo que se hace evidente por el incremento en el desarrollo de blastocistos, en comparación al empleo solamente de FSH, o sin suplementos hormonales durante la maduración (Trounson y col 2001). En el humano se ha sugerido que la FSH intrafolicular actúa sinérgicamente con el estradiol para incrementar la maduración citoplásmica (Dell'Aquila y col 1997). Se ha demostrado que el estradiol es importante para que el ovocito adquiera la competencia de ser fertilizado, las CC lo

secretan durante el cultivo por el estímulo de las gonadotropinas (Dode y Graves, 2003).

La presencia de las hormonas permite la maduración de los receptores en las CC y en las células de la granulosa, y mejora la respuesta a la LH en el cultivo. La LH incrementa la maduración citoplásmica, favoreciendo la formación del PNm, de manera más eficiente que la FSH. Aunque aún no se conocen los mecanismos de este proceso, en el porcino se supone que la acción de la LH puede estar relacionada con la capacidad de estimular la interacción del ovocito con las CC, necesarias para alcanzar la maduración citoplásmica (Trounson y col 2001). Con respecto a este punto, existe controversia, ya que otros autores sugieren que el desacoplamiento de las CC con el ovocito no es un requisito para la reanudación de la meiosis (Mattioli y col 1991).

Como complemento de lo anterior, el EGF también es un elemento importante en la maduración, ya que hay reportes en los que se ha demostrado que mejora la MIV de los ovocitos en roedores, bovinos, porcinos y humanos. El EGF estimuló la producción de glutatión (GSH) en ovocitos de cerda. Además, participa en la descondensación del núcleo del espermatozoide y la formación del PNm, también puede reducir las uniones disulfuro protegiendo a las células contra el daño oxidativo (Abeydeera y col 2000).

Efecto sinérgico del FFp con las gonadotropinas y el EGF

Expansión de las Células del Cúmulo

Al final del periodo de maduración, los COC que maduraron en presencia de FFp1 y FFp2, empleados como suplementos en el medio de MIV con FSH, LH y EGF, presentaron una mayor expansión de las CC que en los grupos testigos (Figura 1), este efecto fue independiente del tamaño de los folículos de los que provino el FFp. Los resultados de este trabajo coinciden con los de Vatzias y Hagen (Ducolomb y col 2003; Vatzias y Hagen, 1999).

Las células somáticas son requeridas para el crecimiento y la maduración del ovocito, esa influencia es ejercida a través de las uniones comunicantes entre las CC y el ovocito. La expansión de las CC está relacionada con la maduración nuclear, aunque precede a la maduración, puede ser considerada en algunos casos como indicador de la competencia de la maduración de los ovocitos (Brüssow y col 2002) (Guthrie y Garrett, 2000). Hay estudios que sugieren que el FFp produce una mayor expansión de las CC que cuando se emplean medios definidos libres de proteína, sin FFp (Daen y col 1994; Yoshida y col 1992b) o si éste es sustituido con PVA, por lo que este efecto puede atribuirse a factores presentes en el FFp (Abeydeera y col 2000).

En ratones, la expansión de las CC requiere de inhibidores de α -tripsina presentes en el FFp, que estabilizan la matriz extracelular a través de su unión directa con el ácido hialurónico. Es posible que algunos factores desconocidos, producidos por el ovocito y/o las CC, se unan con ácido hialurónico para estabilizar la matriz extracelular y dar por resultado su expansión (Abeydeera y col 1998d). En bovinos, el FF colectado 20 horas después de la descarga de LH tuvo un efecto positivo en la expansión de las CC y fue mayor del que se presentó cuando el FF fue colectado a las 0 y 8 horas después del pico de gonadotropinas. Resultados similares se observaron en humanos cuando el FF colectado después de 30 a 40 horas posteriores a la descarga de LH indujo la expansión de CC en ratones (Romero-Arredondo y Seidel, 1994).

En porcinos, se ha encontrado que el desacoplamiento de las CC comienza cuando inicia la maduración y se completa cuando el ovocito llega a la MII (Kikuchi y col 1993). También el EGF puede influenciar la producción de ácido hialurónico y la expansión de las CC. Se ha reportado que esta capacidad se adquiere progresivamente por las células durante el crecimiento folicular (Marchal y col 2002).

Maduración nuclear

En el presente trabajo, el FFp en los medios de maduración tuvo un efecto sinérgico con las gonadotropinas, que benefició la maduración nuclear y citoplásmica. La presencia del FFp de las dos categorías foliculares disminuyó en 80% el porcentaje de ovocitos inmaduros, lo que indica que contiene componentes que favorecen la reanudación de la meiosis. Con el FFp, el porcentaje de ovocitos en MI disminuyó y el porcentaje en MII aumentó, en comparación con los grupos testigo, indicando que los ovocitos avanzaron hacia la MII, lo que indica que el FFp contiene factores que favorecen la maduración nuclear.

Como era de esperarse, estos resultados coinciden con lo reportado por varios autores. Naito y col (1990), observaron que tanto el FFp como el FF bovino al ser empleados como suplemento en los medios de maduración junto con FSH incrementaron la maduración nuclear de los ovocitos porcinos, indicando que hay factores estimulantes en el FF que no son especie específicos. En humanos, el suplemento del medio de maduración con 50% de FF de folículos prevulatorios que contenían ovocitos en MII, incrementó el porcentaje de ovocitos en MII en comparación al empleo de FCS como suplemento (Trounson y col 2001). También se ha reportado que la LH incrementa la concentración de estradiol en el FF, favoreciendo la llegada de los ovocitos a la MII (Ferguson y col 2003).

Maduración citoplásmica y fertilización

El FFp de los dos grupos foliculares promovió la fertilización más eficientemente que los testigos, lo que confirma su efecto positivo en este proceso. Varios estudios confirman lo encontrado en este trabajo, ya que indica que el FFp contiene sustancias que además de inducir la expansión de las CC incrementan la maduración nuclear, la citoplásmica, y promueven la formación del PNm (Daen y col 1994 ; Ducolomb y col 2003; Grupen y col 2003; Naito y col 1990; Vatzias y Hagen, 1999; Yoshida y col 1992b). Además, se ha reportado que el FF porcino y bovino en

el medio de maduración incrementa la maduración y la formación del PNm de manera dosis dependiente (Naito y col 1990).

Entre los factores que limitan la formación de embriones *in vitro* se encuentran las condiciones de maduración de los ovocitos *in vitro*. Para incrementar la maduración nuclear y citoplásmica, los medios de maduración se han suplementado con FFp (Coy y col 1999; Funahashi y Day, 1993a; Naito y col 1988; Vatzias y Hagen, 1999; Yoon y col 2000; Yoshida y col 1992a), éste se ha empleado fresco (Vatzias y Hagen, 1999), congelado (Vatzias y Hagen, 1999), completo (Funahashi y Day, 1993a) o fraccionado (Daen y col 1994; Naito y col 1990; Yoshida y col 1992b). Sin embargo, a pesar de que se han realizado múltiples estudios para mejorar la obtención de embriones porcinos *in vitro* (Abeydeera y col 1998b; Funahashi y Day, 1997; Moor y Trounson, 1977; Niwa, 1993; Yoshida y col 1990), la producción aun es muy baja.

Polispermia

La polispermia aumentó con la presencia del FFp de los dos tamaños foliculares y los porcentajes fueron significativamente más altos que en los grupos testigos. Esto pudo ser causado porque el FFp, al mejorar las condiciones de maduración y fertilización, la favoreció. Este efecto puede ser la consecuencia del incremento en la fertilización. El FFp incrementó de manera significativa la polispermia, aparentemente ejerciendo un efecto sinérgico con las gonadotropinas y el EGF.

En la FIV, la polispermia ocurre en especies como bovinos (Wang y col 1997a), pero se presenta en mayores proporciones en porcinos y en éstos puede alcanzar una proporción mayor del 50% (Han y col 1999a; Li y col 2003; Zheng y Sirard, 1992). Los blastocistos desarrollados a partir de cigotos polispérmicos tienen un número menor de células en la masa interna, a diferencia de los cigotos monospérmicos, y sólo los diploides llegan al final del desarrollo embrionario (Mc Cauley y col 2003).

A pesar de los progresos en los programas de FIV en porcinos, el problema de la polispermia representa el mayor obstáculo para la producción de embriones *in vitro*. En diferentes trabajos se ha intentado disminuirla modificando los medios de MIV y FIV. En los medios de maduración se ha tratado de reducirla por medio de la incubación de los ovocitos con fluido del oviducto, realizando cocultivo de ovocitos con células epiteliales del oviducto (Dubuc y Sirard, 1995) y/o con medios condicionados o con FFp (Vatzias y Hagen, 1999). Funahashi y col (1993b), observaron que la incubación de espermatozoides porcinos con FFp al 1% en el medio de prefertilización disminuyó la polispermia, pero estos autores no usaron el FFp en el medio de maduración.

Se ha sugerido que los altos índices de polispermia durante la MIV y FIV en porcinos pueden ser causados por el envejecimiento del ovocito al inicio de la maduración, de la misma manera que aumenta la polispermia después del envejecimiento posovulatorio de los ovocitos producidos *in vivo* (Guthrie y Garrett, 2000). También se ha reportado que el potencial de desarrollo de los ovocitos de los animales prepúberes es menor que el de los adultos, lo que puede ser la causa de la polispermia observada en los ovocitos de animales prepúberes (Gruppen y col 2003).

Durante la fertilización *in vivo*, la polispermia se evita por la modificación de dos estructuras en el ovocito: la membrana plasmática y la ZP. La importancia de estas estructuras en el bloqueo de la polispermia varía en las diferentes especies (Yanagimachi, 1994), sin embargo, en la mayoría de los mamíferos la ZP es la estructura principal en el bloqueo de la polispermia. Hay dos eventos que están asociados a este proceso: uno es la exocitosis de los GC, llamada reacción cortical, que es iniciada por cambios en las concentraciones de calcio durante la penetración espermática (Wang y col 2003). La liberación intracelular de calcio induce la fusión de la membrana de los GC con el ooplasma y su contenido se libera al espacio perivitelino. El otro evento es la modificación de la ZP por las enzimas liberadas de los GC, también llamado reacción de zona, que cambia la capacidad de la ZP de

fusionarse con los espermatozoides o de inducir la reacción acrosomal, impidiendo de esta manera la penetración de más espermatozoides (Wang y col 2003).

Los ovocitos inmaduros pueden carecer de la capacidad de bloquear la polispermia. Esta incapacidad puede estar asociada a la maduración del ovocito. El análisis de los ovocitos inmaduros indica que tienen una deficiencia para liberar los GC y este proceso está asociado con una activación deficiente del ovocito. Hay hipótesis que pueden explicar esta deficiencia. Una es que los ovocitos inmaduros no son sensibles a la activación cuando son penetrados por el espermatozoide, o cuando son inyectados con calcio o IP_3 . Otra postula que en los ovocitos inmaduros la migración de los GC en el ooplasma es incompleta. Los GC se originan durante el desarrollo temprano del ovocito y la adecuada migración de los GC es necesaria para la exocitosis después de la penetración del espermatozoide, esta migración se produce al final de la maduración. Las gonadotropinas y la polimerización de los microtúbulos tienen importancia en la migración de los GC (Wang y col 2003).

Otra hipótesis indica que existe una reducción en el retículo endoplásmico cortical. El retículo aumenta durante la maduración y es depósito de calcio, por lo que hay menos calcio en los ovocitos inmaduros. Una cuarta hipótesis postula que los ovocitos inmaduros pueden tener menos receptores para IP_3 . Durante la maduración, los receptores de IP_3 aumentan. Cuando los ovocitos están inmaduros, hay menos receptores por lo que tienen menos capacidad de responder a los activadores. Todos estos eventos ocurren cuando el ovocito llega a la MII (Wang y col 2003).

Los resultados del presente trabajo son diferentes a los obtenidos en un estudio en el que se empleó una glicoproteína específica del oviducto, con la que fueron incubados ovocitos porcinos 3 h antes de la FIV, reduciendo la polispermia pero conservando los porcentajes de penetración (Mc Cauley y col 2003). Los resultados también contrastan con otros hallazgos (Vatzias y Hagen, 1999) en donde se encontró que el FFp fresco o congelado, en los medios de maduración y de fertilización redujo la polispermia, sin embargo, no se utilizaron suplementos hormonales.

Efecto del tamaño folicular

En este estudio no hubo diferencia en el grado de expansión de las CC al emplear FFp1 o FFp2. Este mismo efecto fue reportado por Daen y col (1994), al suplementar los medios con FFp de folículos chicos (<2 mm), medianos (2-5 mm) o grandes (>5 mm).

Los resultados de esta investigación indican que los componentes del FFp de folículos grandes o pequeños promovieron la maduración nuclear y citoplásmica que no se vio afectada por el diámetro del folículo del cual provino el FFp empleado como suplemento en el medio de maduración. Estos resultados coinciden con los de Yoon y col (2000), que emplearon FFp proveniente de folículos pequeños (hasta 3.1 mm) y grandes (3.1 a 8 mm) y no encontraron diferencia significativa en la maduración nuclear. Sin embargo el FFp de folículos grandes incrementó la penetración e influyó positivamente en la formación de blastocistos.

Los resultados de este trabajo indican que el FFp tanto de folículos pequeños como grandes, contiene factores que promueven la maduración de los ovocitos *in vitro*. Esto coincide con los estudios de Vatzias y Hagen (1999), quienes encontraron que el FFp de folículos pequeños y medianos incrementó los porcentajes de maduración de ovocitos cuando fue usado como suplemento en la maduración de ovocitos que provenían de la misma categoría folicular.

Por otra parte, Naito y col (1990), señalan un mejor efecto del FFp de folículos de 2 a 5 mm en la maduración nuclear y citoplásmica, que los de mayor tamaño. Sus resultados son diferentes a los de este estudio, ya que no se encontró diferencia significativa entre los FFp provenientes de los dos tamaños foliculares en los porcentajes de maduración nuclear y formación del PNm.

Se ha demostrado que el FF de bovinos y porcinos contiene tanto factores estimulantes como inhibidores, que afectan la maduración del ovocito, y que estos factores pueden reflejar los cambios que ocurren en el folículo durante su crecimiento (Dostál y Pavlok, 1996; Naito y col 1990; Yoon y col 2000).

En porcinos, hay trabajos que muestran que hubo diferencias al emplear FFp de folículos pequeños, medianos y grandes. Ledwitz-Rigby y col (1977), reportaron que el FFp proveniente de folículos antrales de 1-2 mm inhibió la luteinización *in vitro* de las células de la granulosa obtenidas de folículos medianos, que el FFp de folículos de 3-5 mm tuvo un efecto de inhibición menor y el que provino de folículos de 6-12 mm no mostró efecto inhibitorio. En el presente trabajo no se encontró diferencia entre los dos tamaños foliculares, esto puede deberse a que los folículos pequeños abarcaron folículos antrales hasta de 5 mm, que en otros trabajos son considerados como de tamaño mediano.

En este estudio, la polispermia aumentó cuando el FFp estuvo presente en el medio de maduración, con respecto al grupo que sólo tenía gonadotropinas y EGF. Sin embargo, no hubo diferencia con respecto a la categoría folicular de donde provino el FFp. Se ha reportado que el FFp proveniente de folículos grandes (mayores de 5 mm) empleado en el medio de maduración redujo la polispermia, en comparación al uso de FFp de folículos pequeños (menores de 2 mm) y medianos (2 a 5 mm). A diferencia de los resultados obtenidos en el presente trabajo, no se utilizaron gonadotropinas durante la maduración de los ovocitos (Daen y col 1994).

Los resultados de esta parte del trabajo confirman que el FFp junto con las gonadotropinas en los medios de maduración mostró un efecto sinérgico sobre la maduración nuclear y citoplásmica, y que aumentó la penetración, evidenciada por la formación del PNm y la polispermia. Finalmente, en esta sección sólo se analizó el efecto del FFp proveniente de folículos chicos y grandes, sin encontrar diferencia en la maduración y fertilización, pero hace falta conocer si existe alguna diferencia en la producción de blastocistos (Ducolomb y col 2003).

Debido a que en esta parte del trabajo no se encontró diferencia al emplear el FFp de diferente tamaño folicular, se decidió utilizar el FFp de folículos menores de 5 mm para su fraccionamiento y el análisis de las fracciones proteínicas, para probar su efecto sobre la maduración, fertilización y polispermia.

7.2. Fraccionamiento del Fluido Folicular Porcino por medio de cromatografía de intercambio aniónico

7.2.1. RESULTADOS

Fraccionamiento del FFp

El FFp empleado para este estudio tuvo una concentración de proteína de 63 mg/ml. Se hicieron las diluciones adecuadas para tener una de 10mg/ml ya que esta es la concentración adecuada para llevar a cabo la inyección para realizar el fraccionamiento y no saturar la columna.

Un cromatograma típico del FFp se muestra en la Figura 3. Se colectaron 98 fracciones de 0.5 ml cada una. Las fracciones se agruparon para su análisis en 5 superfracciones, a las que se nombraron "Regiones". El pico de inyección no se colectó por que en las electroforesis preliminares no se pudieron poner en evidencia proteínas en esa fracción. La conductividad fue proporcional al gradiente de NaCl de la solución, lo que indica que el formador de gradientes funcionó de manera adecuada. Se pueden observar 5 picos principales: los dos primeros se agruparon en la R2 y uno en cada una de las regiones restantes.

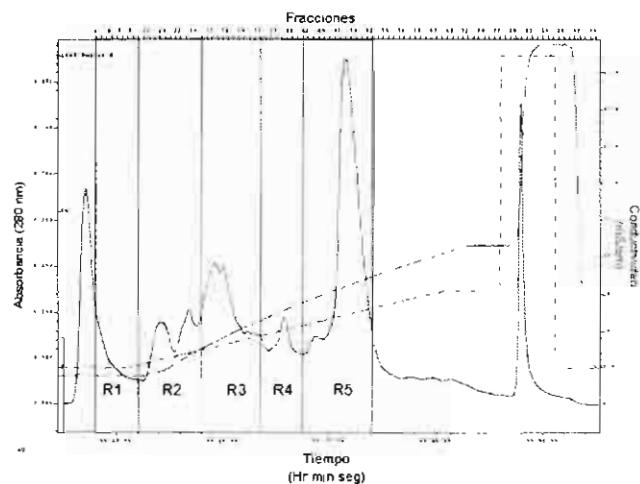


Figura 3. Cromatografía de Intercambio Iónico del FFp, empleando una columna de aminas cuaternarias en donde se observa el agrupamiento de las fracciones en cinco Regiones.

En el Cuadro 5 se muestra un resumen de los resultados del fraccionamiento del FFp. Se puede observar que la cantidad de proteína recuperada en cada región fue del 5 al 50% de la proteína total, obteniéndose un rendimiento general del 80% (478 de 600 mg totales).

Cuadro 5. Análisis de la cromatografía de intercambio aniónico de las proteínas del FFp

Región	Fracciones reunidas	Número de fracciones agrupadas	Proteína (mg/ml)	Proteína total (mg)	Porcentaje de la proteína total
R1	2 - 10	9	0.33	29.9	5.0
R2	11 - 22	12	0.47	56.4	9.4
R3	23 - 33	11	0.54	59.4	9.9
R4	34 - 41	8	0.38	30.2	5.0
R5	42 - 54	13	2.32	302.2	50.4
Total	--	--	--	478.2	79.7

Se introdujeron 600 mg de proteína en un total de 60 inyecciones.

Análisis de las proteínas de las regiones del FFp

La electroforesis del FFp y sus fracciones proteínicas se muestra en la Figura 4. Se probaron geles con diferentes concentraciones de acrilamida, el de 10% fue el adecuado para el análisis. Se determinó el número de bandas proteínicas de cada muestra y la masa molecular relativa (M_r) de cada una. La FSH, LH y el Pergonal se utilizaron para efectos comparativos. El FFp presentó 11 bandas claramente definidas con M_r que fluctuaron de 151 a 16 kDa. Todas las bandas presentes en el electroferograma del FFp se presentaron por lo menos una de las regiones.

R1 y R2 presentaron 4 bandas con M_r entre 79 y 16 kDa. Se observa que la intensidad de la banda de 79 en R1 es menor que en R2. En R3 se observaron 8 bandas con M_r de 93 a 16 kDa. R4 mostró 12 bandas, siendo el número mayor que las otras regiones, con M_r entre 127 y 16 kDa. En la R5 se encontraron 7 bandas, de 139 a 16 kDa. La FSH presentó 6 bandas con M_r de 79 a 15 kDa. La LH tuvo 5 bandas, de 127 a 16 kDa y el Pergonal mostró 6, de M_r entre 67 y 16 kDa (Cuadro 6).

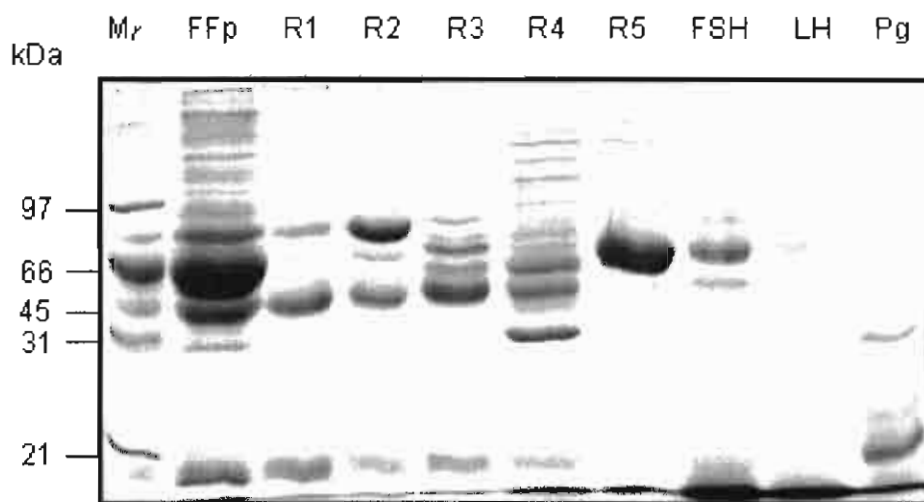


Figura 4. Electroforesis en gel de acrilamida en presencia de SDS en medio reductor de FFp en donde se observan las bandas proteínicas de las cinco regiones.

Mr: marcadores de masa molecular, FFp: fluido folicular porcino, R1-R5: superfracciones del fluido folicular porcino salidas de intercambio aniónico, FSH: hormona folículo estimulante, LH: hormona luteinizante, Pg: pergonal.

Cuadro 6. Masa molecular relativa de las bandas proteínicas del FFP y de las fracciones de cromatografía de In por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS en condiciones reductoras.

Mr	FFp	R1	R2	R3	R4	R5	FSH	L
160-150	151							
149-140								
139-130	139					139		
129-120	124				127	124		12
119-110					114	117		
109-100	108				105			
99-90	99							
	91			93	91			
89-80					84			
79-70		79		79			79	
	77		77		75			
				71	71			
69-60		67	67	67				6
						65		
							63	
				60	61			
59-50	58		50	50	52	53	53	5
49-40	45	46			41			
39-30	38					39	38	
29-20								2
19-10				19	19			
	16	16	16	16	16	16	17	1
							15	
TOTAL	11	4	4	8	12	7	6	5

7.2.2. DISCUSIÓN

Algunas de las proteínas presentes en el FF son transportadas al folículos provenientes de la sangre a través de la barrera folicular; otras, son secretadas por las células de la granulosa y la teca, ambas tienen un papel importante en la regulación de la maduración del folículo y la ovulación (Spitzer y col 1996). La cantidad y tipo de las proteínas en el FF se incrementa durante la foliculogénesis. Gallardo-Ornelas y col (2001), encontraron en una fracción del FFp, obtenida por ultrafiltración y cromatografía de intercambio iónico, que incrementó la maduración al añadirla en el medio de maduración suplementado con gonadotropinas. Este efecto disminuyó cuando se trató con proteasas, demostrando la naturaleza proteínica de los componentes involucrados en la maduración. Aunque en el FF se encuentran otros elementos no proteínicos, en el presente estudio también se analizó el efecto de las fracciones proteínicas sobre la maduración, fertilización y polispermia sin interferencia de gonadotropinas.

El conocimiento de las proteínas del FF ha contribuido al conocimiento de los procesos fisiológicos que están relacionados con el crecimiento folicular y la maduración del ovocito. Dentro de estas proteínas se ha estudiado la importancia de la FSH y LH en la maduración del ovocito. En el FF también está el EGF, un péptido de 6 kDa que estimula la producción de progesterona, IGF-1 que promueve la maduración folicular, la diferenciación de las células de la granulosa y aumenta el efecto esteroideogénico de la FSH en estas células. Hay citocinas también involucradas en la regulación de la esteroideogénesis y la maduración folicular como la interleucina -1, -2, -6, macroglobulinas e inmunoglobulinas. En los folículos pequeños hay inhibina, y en los maduros activina, ambas proteínas regulan el crecimiento folicular. También hay folistatina, proteínas cinasas, y superóxido dismutasa, entre otras (Spitzer y col 1996).

En el FF existen proteoglicanos que mantienen la viscosidad del fluido durante la maduración folicular. En el porcino, los proteoglicanos del FF están formados por 20% de proteínas, 50% de dermatán sulfato y 20% de oligosacáridos ricos en ácido siálico, galactosa, manosa, glucosamina y galactosamina

(Yanagishita y col 1979). En el humano los proteoglicanos se han relacionado con la expansión de las CC, la fertilización y el desarrollo embrionario. Se ha reportado que en el FF de bovinos, porcinos y ovinos hay proteoglicanos sulfatados que causan una baja coagulación por su unión con antitrombina, proceso necesario para mantener la fluidez del FF hasta la liberación del ovocito en la ovulación (Shimada y col 2001). En el presente trabajo no se determinó que tipo de proteínas están representadas en la electroforesis.

La cromatografía de intercambio iónico es una técnica no desnaturizante que permite aislar fracciones proteínicas tomando como base el punto isoeléctrico de cada proteína. La distribución de proteínas dentro de las fracciones fue adecuada para el análisis, algunas de las proteínas que se encuentran en menor concentración pudieron observarse claramente en la electroforesis de las fracciones aunque no pudieron ser observadas en la electroforesis del FFp. Este efecto de concentrar la muestra es característico de la cromatografía de intercambio aniónico.

La concentración de ciertas proteínas refleja la condición fisiológica del folículo. Un estudio realizado con FF humano proveniente de folículos inmaduros y maduros en el que las proteínas se separaron por electroforesis de dos dimensiones indicó que hay proteínas que están presentes en los folículos maduros y ausentes o poco expresadas en los inmaduros (Spitzer y col 1996).

En la FIV en humanos, la concentración de ciertas proteínas del FF son clínicamente útiles ya que algunas se han relacionado con la inducción de la reacción acrosomal y la capacitación espermática. Además, se ha demostrado que la presencia de factores proteínicos en el FF está relacionada con la maduración folicular, por lo que se ha sugerido hacer análisis electroforéticos del FF para determinar el estado de maduración del ovocito (Spitzer y col 1996). Es por esto que la identificación molecular de las proteínas tiene utilidad clínica, como una prueba para la elección de folículos con ovocitos maduros que pueden aportar mejores resultados en los programas de FIV. Es necesario identificar las proteínas

responsables de los efectos observados en el presente trabajo mediante secuenciación o espectrometría de masas.

 XOXIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

7.3. Efecto de las fracciones proteínicas del FFp en la maduración, fertilización y polispermia

7.3.1. RESULTADOS

Maduración de los COC con fracciones proteínicas del FFp1 obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico

Para el análisis de las regiones proteínicas obtenidas por el fraccionamiento del FFp se formaron 8 grupos: 3 testigos y 5 regiones proteínicas. Cada grupo consistió en medio de maduración con los siguientes suplementos:

- a) Testigo negativo (SSH)
- b) Testigo positivo (CSH)
- c) FFp (10%)
- d) Región 1 (R1) (10%)
- e) Región 2 (R2) (10%)
- f) Región 3 (R3) (10%)
- g) Región 4 (R4) (10%)
- h) Región 5 (R5) (10%)

Se tomó al FFp como un tercer testigo para hacer la comparación de las regiones proteínicas. En los ensayos para cada región proteínica se incluyó el testigo negativo, el testigo positivo y el FFp. Se evaluaron en total 4012 ovocitos. Los resultados obtenidos en estos experimentos se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Promedio de los porcentajes de maduración, fertilización y polispermia en ovocitos cultivados en medio de MIV con las fracciones proteínicas del FFp.

Tratamiento	Ensayos	VG	MI	MII	Fertilizados (PNm)	Eficiencia de la fertilización	Polispermia
SSH	14	39	15	46	25	53	34
CSH	15	6	13	81	51	61	37
FFp	11	25	11	64	36	53	24
R1	4	38	13	48	33	69	24
R2	5	42	7	51	31	56	31
R3	3	51	7	42	23	53	34
R4	3	48	9	43	28	65	32
R5	5	27	18	55	33	58	28

Número de ovocitos analizaros por grupo: 742 SSH, 815 CSH, 738 FFp, 314 R1, 380 R2, 304 R3, 276 R4 y 443 R5.

VG: ovocitos inmaduros con vesícula germinal; MI: ovocitos en metafase I que están en vías de maduración; MII: ovocitos en metafase II maduros+fertilizados; PNm ovocitos fertilizados; Eficiencia de la fertilización: ovocitos fertilizados /madurados.

Debido a la variabilidad de los datos en los diferentes ensayos los porcentajes promedio obtenidos en el Cuadro 7 se normalizaron, tomando los valores del grupo SSH que corresponde a los ovocitos con maduración espontánea, como el 100% (Cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentaje normalizado de maduración, fertilización y polispermia en ovocitos cultivados en medio de MIV con o sin suplementos hormonales, y 10% de FFp o 10% de cada una de las 5 regiones proteínicas.

Tratamiento	VG	MI	MII	Fertilización (PNm)	Eficiencia de la fertilización	Polispermia
SSH	100	100	100	100	100	100
CSH	16 ^a	87 ^a	176 ^a	204 ^a	115	109
FFp	66 ^a	73 ^a	139 ^a	144 ^a	100	71 ^a
R1	100	87 ^a	104	132 ^a	130 ^a	71 ^a
R2	111	47 ^a	111	124 ^a	106	91
R3	134 ^a	47 ^a	91	92	100	100
R4	126 ^a	60 ^a	93	112	123 ^a	94
R5	71 ^a	120 ^a	120 ^a	132 ^a	109	82

^a Indica diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control negativo

En este cuadro se muestran los porcentajes obtenidos en la maduración y fertilización de ovocitos con fracciones proteínicas del FFp, después de haberse realizado diversos ensayos.

Efecto del FFp y las regiones proteínicas en la maduración, fertilización y polispermia

CSH

Como era de esperarse, el grupo CSH tuvo un efecto positivo en la maduración. Disminuyó 84% en el porcentaje de ovocitos que permanecieron inmaduros y 13% en los ovocitos que presentaron MI con respecto al grupo SSH. Este grupo tuvo un aumento del 76% en el porcentaje de ovocitos que llegaron a la MII. Cuando se analizaron los ovocitos fertilizados con respecto al número total, se observó que el grupo CSH aumentó 104 % de fertilización con respecto al grupo SSH (Cuadro 8, Figura 5).

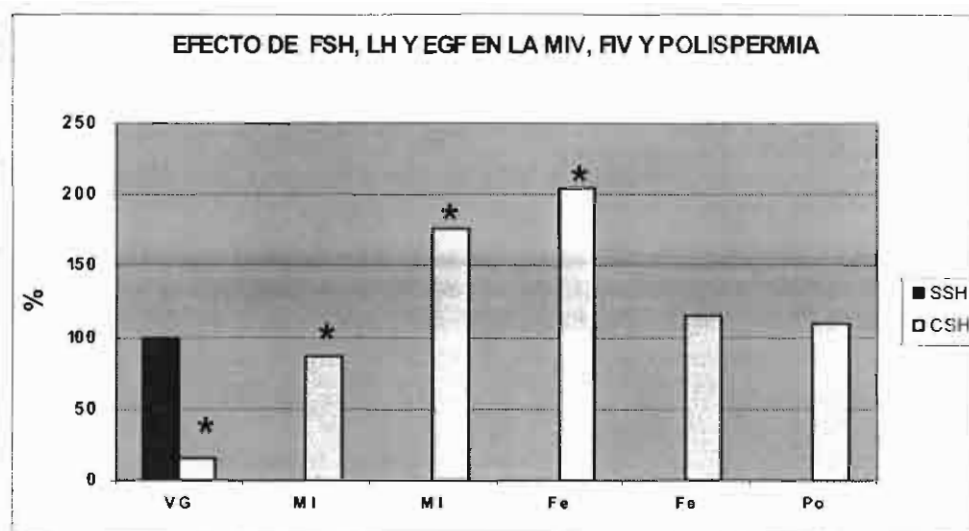


Figura 5. Comparación entre el medio de MIV con suplementos hormonales y el medio sin suplementos.

*Indica diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al testigo negativo.

FFp

El FFp tuvo un efecto similar al del grupo CSH en la maduración nuclear y la citoplásmica. Presentó una disminución significativa ($p < 0.05$) del 34% en el porcentaje de ovocitos inmaduros con relación al grupo SSH. El porcentaje de ovocitos en vías de maduración en MI disminuyó 27%. El porcentaje de ovocitos en MII aumentó 39%, lo que indica que el FFp propicia la maduración nuclear. Hubo un aumento en el porcentaje de fertilización del 44%, lo que sugiere un efecto positivo en la maduración citoplásmica. En cuanto al índice de ovocitos penetrados por más de un espermatozoide, el FFp lo redujo significativamente (29%) con respecto al grupo SSH (Cuadro 8, Figura6).

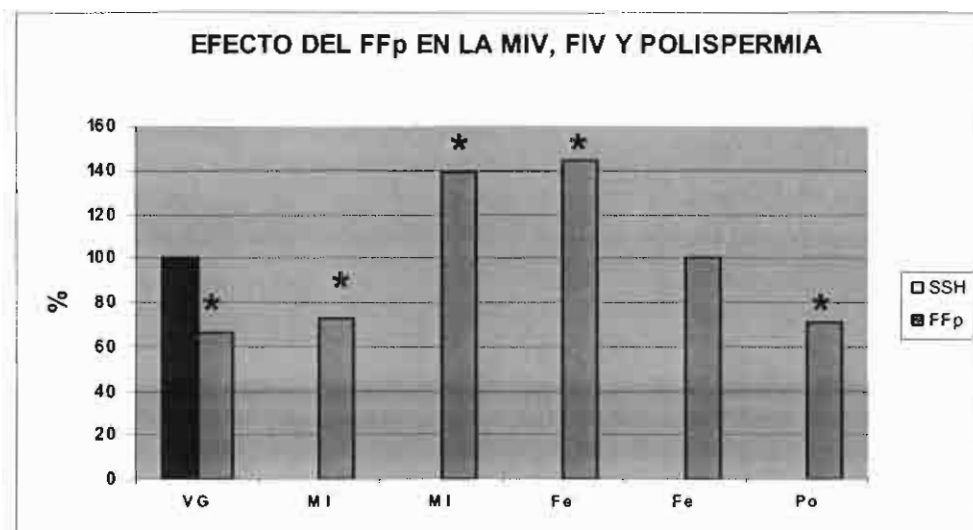


Figura 6. Comparación entre el medio de MIV con FFp y el medio sin suplementos hormonales.

*Indica diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al testigo negativo.

R1

El porcentaje de ovocitos en vías de maduración que presentaron MI en el grupo R1 tuvo una disminución del 13% con respecto al grupo SSH. Cuando se analizaron los ovocitos fertilizados con respecto al número total, este grupo tuvo un aumento del 32%, siendo esta diferencia significativa. Al evaluar el porcentaje de ovocitos fertilizados con respecto al de ovocitos maduros (eficiencia de la fertilización), también presentó un aumento del 30%, lo que sugiere que esta región propicia la fertilización y la maduración citoplásmica en ovocitos que maduraron espontáneamente, ya que no propició el rompimiento de la VG. Además su presencia disminuyó significativamente el porcentaje de polispermia (29%) con respecto al grupo SSH (Cuadro 8, Figura 7).

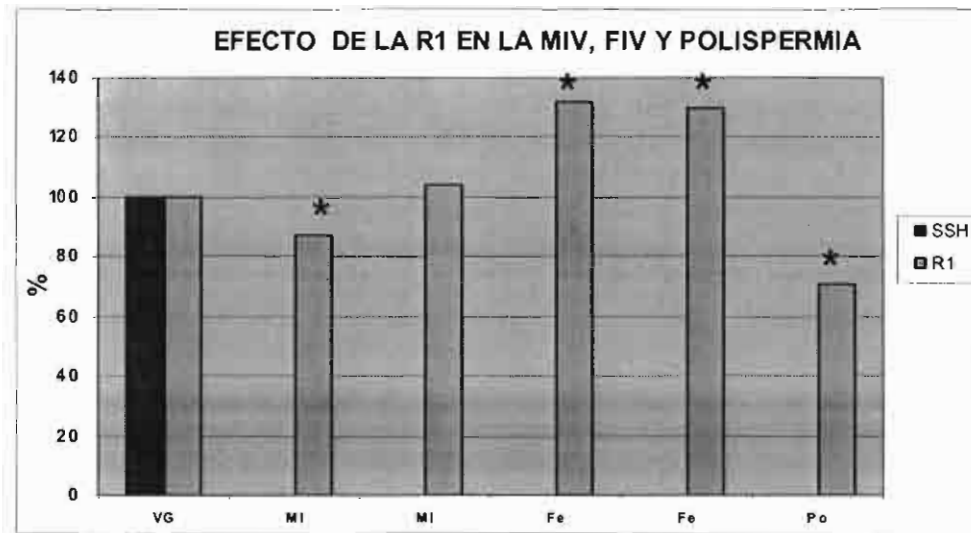


Figura 7. Comparación entre el medio de MIV con R1 y el medio sin suplementos hormonales.

*Indica diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al testigo negativo.

R2

La R2 presentó una disminución del 53% en el porcentaje de ovocitos en MI con respecto al grupo SSH. Este grupo tuvo un aumento del 24% cuando se evaluó la fertilización sobre el número total, indicando que tiene un efecto positivo sobre la maduración citoplásmica de los ovocitos que maduraron espontáneamente. (Cuadro 8, Figura 8).

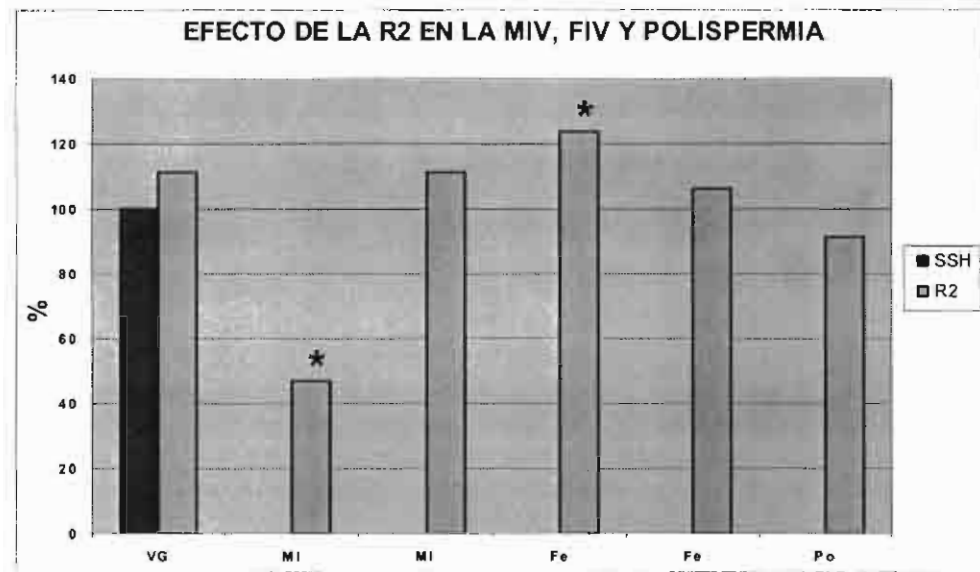


Figura 8. Comparación entre el medio de MIV con R2 y el medio sin suplementos hormonales.

*Indica diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al testigo negativo.

R3

Al evaluar la presencia de la VG para determinar los porcentajes de ovocitos inmaduros, el grupo R3 presentó un aumento significativo del 34% y mostró una disminución del 53% en los ovocitos en MI, indicando un efecto inhibitorio sobre la maduración nuclear y citoplásmica (Cuadro 8, Figura 9).

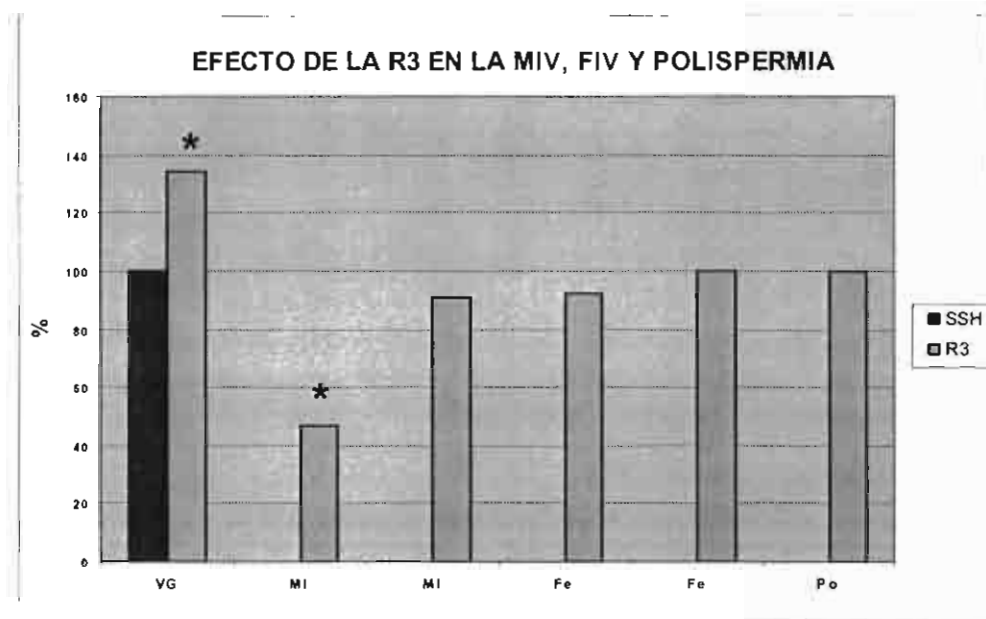


Figura 9. Comparación entre el medio de MIV con R3 y el medio sin suplementos hormonales.

*Indica diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al testigo negativo.

R4

La R4 tuvo un aumento del 26% en el porcentaje de ovocitos que presentaron inhibición del rompimiento de la VG y por lo tanto un descenso del 40% en el porcentaje de ovocitos en MI. Al evaluar la eficiencia de la fertilización, este grupo tuvo un aumento del 23% con respecto al grupo SSH, sugiriendo que esta región tiene un efecto inhibitorio en la maduración nuclear y un efecto positivo en la fertilización (Cuadro 8, Figura 10).

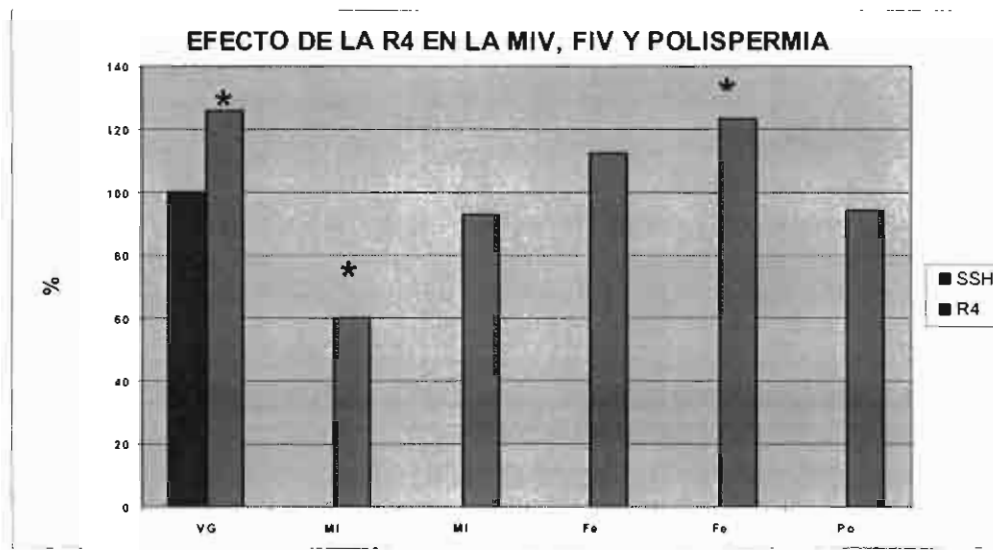


Figura 10. Comparación entre el medio de MIV con R4 y el medio sin suplementos hormonales.

*Indica diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al testigo negativo.

R5

Cuando se evaluaron los ovocitos para determinar el estado de la VG, se observó que el grupo R5 tuvo una disminución significativa del 29% en el porcentaje de ovocitos inmaduros. Al analizar los ovocitos en vías de maduración que presentaron MI y los que progresaron a la MII, se observó un aumento del 20% en ambos. Además tuvo un aumento del 32 % en el porcentaje de ovocitos fertilizados sobre el número total. Esto indica que la R5 promovió el rompimiento de la VG y la maduración nuclear y citoplásmica (Cuadro 8, Figura 11).

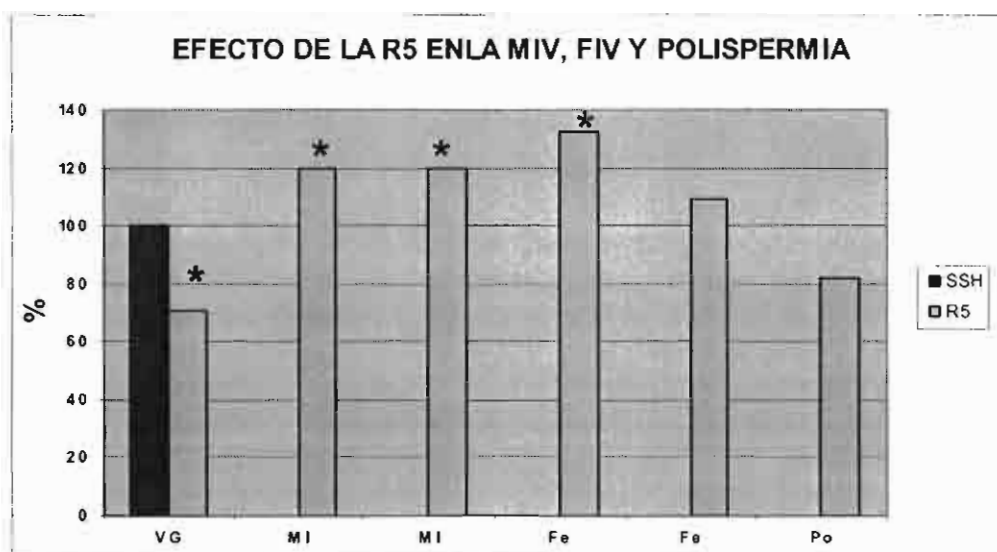


Figura 11. Comparación entre el medio de MIV con R5 y el medio sin suplementos hormonales.

*Indica diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al testigo negativo.

7.3.2. DISCUSIÓN

El grupo CSH mostró un comportamiento similar al que se observó en la primera parte de este trabajo. Las gonadotropinas promovieron el rompimiento de la VG, incrementaron la maduración nuclear, citoplásmica y la fertilización. Esto puede apreciarse por la disminución en los porcentajes de ovocitos inmaduros y en MI, y por el aumento en los porcentajes de ovocitos en MII. También se observó un alto porcentaje de maduración citoplásmica que se refleja por la capacidad de promover la formación del PNm después de la fertilización, que se duplicó con respecto al testigo negativo y no tuvo efecto sobre la polispermia.

Efecto del FFp

A diferencia de la primera sección del presente trabajo, en esta parte de este estudio, el FFp no fue suplementado con gonadotropinas. El FFp tuvo un efecto similar al del grupo con gonadotropinas y EGF, ya que se observó un descenso en el porcentaje de ovocitos que permanecieron inmaduros y de aquellos en vías de maduración. Incrementó el paso de los ovocitos hacia la MII, lo que indica su efecto positivo sobre la maduración nuclear y citoplásmica.

En un estudio realizado en humanos, el FF redujo el efecto inhibitorio de las purinas que mantienen la detención meiótica, por consiguiente se sugirió la presencia de factores que propician la reanudación de la meiosis (Chi y col 1998). Estos hechos fueron coincidentes con los del presente estudio ya que la presencia del FFp redujo el porcentaje de ovocitos en estado de VG con respecto al testigo negativo.

En el estudio presente, el FFp tuvo el mismo comportamiento sobre la maduración nuclear que los suplementos hormonales. Este hecho difiere de lo indicado por Tsafiri y Channing (1975), quienes encontraron que el FFp de folículos pequeños y grandes inhibió la MIV cuando el medio no fue suplementado con gonadotropinas y esteroides. El comportamiento del FFp puede deberse a la presencia de factores promotores regulados por hormonas, que ejercen un efecto positivo sobre la maduración. Estos resultados también difieren con el trabajo de

Gallardo-Ornelas y col (2001), en el que el FFp completo en el medio de maduración inhibió el progreso de la MI a la MII, sugiriendo que este efecto puede deberse a la presencia de proteínas que inhiben o detienen la meiosis en MI.

El FFp contribuyó a la maduración citoplásmica de la misma forma que ocurrió cuando los suplementos hormonales estuvieron presentes. Esto coincide con lo reportado por Naito y col (1990), quienes indican que el FFp tiene factores activos que promueven la maduración citoplásmica de los ovocitos en porcinos y bovinos.

Los factores del FFp que estimulan la maduración citoplásmica del ovocito aún no se conocen aunque se han sugerido algunos. Wang y Niwa encontraron que el FFp contiene sustancias parecidas al EGF en altas concentraciones y es posible que estas sean las estimulantes de la maduración (Wang y Niwa, 1995). Se ha comprobado que el EGF también puede estimular la maduración citoplásmica en los ovocitos murinos y humanos (Ding y Foxcroft, 1994).

Con respecto a la polispermia, la presencia del FFp en el medio de maduración contribuyó a disminuirla con respecto al testigo negativo. Los resultados de este estudio coinciden con los hallazgos de Vatzias y Hagen (1999), quienes encontraron que el FFp fresco o congelado, en los medios de maduración y de fertilización redujo la polispermia, estos autores tampoco utilizaron suplementos hormonales en los medios de maduración.

La disminución de la polispermia con el FFp contrasta con los resultados que se obtuvieron en la primera parte, cuando el FFp acompañado por gonadotropinas y EGF incrementó la polispermia con respecto a los testigos positivo y negativo. Lo anterior permite suponer que el efecto aditivo de las hormonas, el EGF y el FFp es benéfico para la maduración y la formación del PNm, sin embargo no favorece la fertilización monospérmica.

Las M_r de las bandas proteínicas que el FFp presentó en el electroferograma abarcaron las M_r de las bandas de las cinco regiones, y la de mayor M_r (151 kDa) no se observó en las regiones. Hay bandás en las regiones

que no aparecen en el FFp, esto puede deberse a que en él su concentración es baja, o están mimetizadas por otras bandas con mayor concentración. Durante el fraccionamiento y la purificación, las proteínas presentes en las regiones se concentran y se hacen evidentes en el gel debido a la tinción con el azul de Coomassie.

Efecto de las Regiones proteínicas del FFp

R1

La R1 incrementó la maduración nuclear y citoplásmica de los grupos de ovocitos que espontáneamente rompieron la VG. La disminución significativa del porcentaje de ovocitos en MI y el bajo porcentaje de ovocitos en la MII se explica por el aumento de la fertilización con respecto al testigo negativo. La eficiencia de fertilización también se incrementó, lo que apoya su efecto positivo sobre la penetración espermática. Esto indica que la R1 tiene componentes que no están relacionados con el rompimiento de la VG, pero cuando los ovocitos ya pasaron este proceso, estimulan su maduración y la fertilización.

La R1 presentó un efecto benéfico en la fertilización monospermica, ya que disminuyó la polispermia en la misma proporción que el FFp. Al analizar el electroferograma, la R1 presentó una banda con una M_r de 46 kDa que no aparece en las otras regiones, mientras que el FFp presentó una banda similar. Por lo anterior, es posible que el efecto que tuvo la R1 en disminuir la polispermia sea causado por esta banda proteínica de 45-46 kDa encontrada tanto en el FFp como en esta región.

Yoshida y col (1990), encontraron una fracción del FFp ácida termolábil con M_r de 10 a 200, kDa que al estar presente en el medio de maduración disminuyó la polispermia. En el presente estudio se postula que la banda proteínica de 46 kDa puede ser responsable de la disminución de la polispermia.

Daen y col (1994), encontraron que una de las fracciones del FFp obtenida por ultracentrifugación en el medio de maduración, tuvo un efecto benéfico en la expansión de las CC y promovió la formación del PNm, pero produjo altos

porcentajes de polispermia. La cromatografía de esta fracción por HPLC produjo una subfracción termoestable a 100°C de bajo M_r (menor de 6.5 kDa) que fue responsable de la expansión de las CC. Esta fracción no fue detectada en este trabajo.

R2

La R2 presentó un efecto similar al de la R1, aunque en menor grado, sobre la maduración nuclear y citoplásmica. El comportamiento semejante entre estas regiones puede deberse a que las dos mostraron el mismo número y patrón similar de bandas proteínicas en el gel, con M_r muy cercanos. Sin embargo, a diferencia de la R1, la R2 no incrementó la eficiencia en la fertilización. La R1 presentó una banda de 79 kDa y la R2 una de 77 kDa, en donde se puede observar que en la banda de la R1, la concentración de proteína es menor. La banda de 67 kDa, presente en las dos regiones, tiene una mayor concentración de proteína en R2. Esto permite suponer que el incremento en la eficiencia en la fertilización se debe a la concentración de cada una de las proteínas de 79, 77 y 67 kDa en cada una de estas dos fracciones.

R3

La presencia de la R3 en el medio de maduración de ovocitos tuvo un efecto inhibitorio sobre el rompimiento de la VG, por lo que también disminuyó el número de ovocitos en MI y en MII, y tampoco tuvo efecto en la fertilización. Por lo anterior, se concluye que alguna o algunas proteínas presentes en esta fracción tienen efecto inhibitorio en la maduración tanto nuclear como citoplásmica. La R3 tuvo 2 bandas proteínicas de 71 y 19 kDa que también se presentaron en la R4. Estas bandas corresponden a proteínas que pueden estar relacionadas con el efecto inhibitorio de la maduración.

R4

La R4 tuvo un comportamiento similar a la R3 sobre la maduración nuclear y la citoplásmica. La R4 mejoró la eficiencia de fertilización respecto al testigo negativo cuando los ovocitos maduraron de manera espontánea. Esto significa que esta región puede tener un factor que promueve la fertilización. Este efecto fue similar al que presentó la R1, aunque estas dos regiones no comparten bandas de M_r similares, por lo que estas similitudes y diferencias deberán ser estudiadas.

Las R3 y R4 mostraron un efecto inhibitorio en la maduración nuclear y citoplásmica y tuvieron una banda proteínica de baja M_r (19 kDa). Esta banda puede estar relacionada con las fracciones inhibitorias de bajo peso molecular descritas por Yoshida y col (1992b), quienes encontraron una fracción de menos de 10 kDa con efecto inhibitorio sobre la formación del PNm. Este efecto inhibitorio también coincide con el trabajo de Naito y col (1990), que describieron una fracción con M_r menor de 25 kDa que no tuvo efecto en la maduración nuclear y citoplásmica.

No se puede descartar la posibilidad de que la banda de 71 kDa presente en la R3 y R4 también pueda tener un efecto en la inhibición de la maduración nuclear y citoplásmica, ya que hay autores que describieron un efecto inhibitorio en fracciones que no eran de bajo peso molecular. Dostál y Pavlok, describieron que el FF de bovino contiene proteínas inhibitorias que impiden la maduración de los ovocitos de la misma especie. Estos autores aislaron una proteína de 60 kDa, que perdió su estabilidad al ser dializada, por lo que cabe la posibilidad de que el compuesto responsable del efecto inhibitorio sea una molécula de menor tamaño que se haya separado de esta fracción durante la diálisis (Dostál y Pavlok, 1996).

R5

La R5 favoreció el rompimiento de la VG, lo que puede evidenciarse por la disminución en el porcentaje de ovocitos inmaduros. Esta región propició el progreso de los ovocitos a MI y a MII y favoreció la formación del PNm, por lo que tuvo un efecto benéfico en la fertilización. Por lo tanto, esta región está involucrada en promover la maduración nuclear y citoplásmica, y propicia la fertilización.

Comparado con el FFp, la R5 produjo una mayor cantidad de ovocitos en MI, por lo que se puede suponer que algunos ovocitos se detuvieron en esta fase o que su paso hacia la MII fue más lento, debido a esto, se supone que hay factores en el FFp que contribuyen a que los ovocitos alcancen más rápidamente la maduración.

A diferencia de las otras regiones, la R5 presentó dos bandas proteínicas con M_r de 139 y 124 kDa, que también se presentaron en el FFp, debido a esto, se cree que pueden ser las responsables del rompimiento de la VG y la maduración.

Al igual que el FFp y el grupo CSH, esta región fue la única que promovió el rompimiento de la VG. Por consiguiente, estas bandas pueden estar relacionadas con la capacidad de favorecer el paso a la MII, con un efecto que favorece la maduración nuclear. Por su M_r , estas bandas pueden ser semejantes a la fracción reportada por Yoshida y col (1992b), que mejoró la maduración nuclear y la fertilización. Estos mismos autores sugirieron que además del FFp completo, que tuvo un efecto benéfico en la maduración nuclear, fertilización y división embrionaria, algunas de las fracciones obtenidas por ultrafiltración, por cromatografía de intercambio iónico o filtración en gel, tuvieron el mismo efecto. Esta actividad la reportaron en una fracción con M_r de 10 a 200 kDa y determinaron que su naturaleza era ácida. Los ovocitos madurados con esta fracción después de la fertilización produjeron embriones que al ser transferidos llegaron a término (Yoshida y col 1993).

Naito y col (1990), obtuvieron una fracción de más de 12 Kda, termoestable a 56°C por 30 min, con un efecto estimulante sobre la formación del PNm. Estos autores indican que la inhibina, producida por las células foliculares de la granulosa, o los glicosaminoglicanos como el condritín sulfato y heparán sulfato, producidos por las células de la granulosa en respuesta a la FSH, pueden ser las moléculas responsables de este efecto en el FFp. Sin embargo, según Yoshida y col (1992a), a diferencia de lo encontrado por Naito y col (1990), reportaron que la actividad de este compuesto sobre la maduración nuclear se perdió cuando se calentó a 56°C por 30 min. Por lo tanto se duda que el efecto sea debido a glicosaminoglicanos, pero sugirió que puede ser de carácter lipídico.

En un trabajo realizado por Gallardo-Ornelas y col (2001), se obtuvo una fracción proteínica que en el medio de maduración adicionado con gonadotropinas, incrementó la maduración.

La R5 fue la única que presentó una banda proteínica de 53 kDa, que aparece también en el electroferograma de la FSH y la LH utilizadas en este estudio. Esta región, al igual que las gonadotropinas, tuvo un efecto favorable en la maduración nuclear y citoplásmica.

Las R1, R2, R3 y R4 presentaron bandas proteínicas con M_r similares, de 79 a 75 kDa que no estuvieron presentes en la R5, pero que sí se encontraron en el FFp. Ninguna de estas regiones promovió el rompimiento de la VG, por lo que existe la posibilidad de que estas proteínas puedan corresponder a factores involucrados con el mantenimiento de la VG. El hecho de que estas bandas estén en el FFp puede deberse a que está compuesto por todas las regiones y entre sus funciones, está la de regular la maduración de los ovocitos.

Los grupos CSH, FFp, R1, R2 y R5 presentaron un incremento en el desarrollo del PNm. Sin embargo, no se encontraron bandas proteínicas de la misma M_r en estas regiones, por lo que se puede suponer que en la maduración citoplásmica debe estar involucrada más de una proteína del FFp.

Aunque la R5 no mostró una diferencia significativa en la reducción de la polispermia (18%) en comparación con el FFp y la R1 (30%) se observó que esta región tuvo una tendencia a disminuirla.

Polispermia

La fertilización monospérmica es una característica esencial para la reproducción de los mamíferos. La polispermia es una condición patológica en los mamíferos que impide el desarrollo o provoca anomalías en el estado embrionario temprano. El bloqueo a la polispermia ocurre a nivel de la ZP o de la membrana plasmática.

La incidencia de polispermia en el ovocitos porcino *in vivo* es muy alta (30-40%) en comparación con otras especies. Xia y col (2001), indican que la polispermia puede ser una condición fisiológica particular del porcino. Estos autores realizaron un estudio en el que se analizaron por medio de microscopía electrónica embriones producidos *in vivo*, en estado de cigoto hasta mórula. Los embriones mostraron blastómeros con espermatozoides accesorios, lo que sugiere que en el porcino, la interacción del espermatozoide con el ovocito no se detiene inmediatamente después de que ocurre la fertilización. Este estudio reveló la presencia de lisosomas con cabezas espermáticas no descondensadas, sugiriendo que los embriones pueden tener la capacidad de eliminar en cierta medida los espermatozoides excedentes mediante la actividad lisosómica.

Han, y col (1999b), reportaron que hay embriones polinucleares que pueden desarrollarse y llegar a término, ya que no todos los PNm de los ovocitos fertilizados participan en la singamia. Sin embargo, una gran proporción de los embriones producidos por fertilización polispérmica, tienen patrones anormales de división y presentan poliploidías.

En la FIV, la polispermia es uno de los mayores problemas ya que puede llegar hasta el 65%. Esto disminuye la cantidad de ovocitos que se desarrollan hasta blastocistos (Abeydeera y Day, 1997; Li y col 2003; Wang y col 1998; Xia y col 2001). La polispermia es una condición multifactorial que puede ser producida

entre otras razones, por las condiciones del cultivo, durante la maduración de los ovocitos *in vitro*. Existe una relación entre la maduración adecuada y la capacidad para llevar a cabo la exocitosis por parte de los GC que impiden la polispermia después de la penetración. Debido a esto, los ovocitos con maduración nuclear y citoplásmica adecuada son capaces de ser activados y de poner en marcha los mecanismos del bloqueo de la polispermia a nivel del oolema y de la ZP, por lo que es más factible que estos ovocitos tengan una fertilización monospérmica. Esto se relaciona con el estado fisiológico del animal, ya que los ovocitos madurados *in vitro* de los animales prepúberes son menos competentes y pueden tener una predisposición a la polispermia. En la polispermia también se involucran factores que corresponden a los espermatozoides. El empleo de concentraciones espermáticas adecuadas durante la FIV es importante para disminuir la polispermia. Las causas de la polispermia aun se encuentran en estudio y no se conoce lo suficiente para reducirla a nivel de laboratorio (Han y col 1999a; Han y col 1999b; Niwa, 1993).

En el presente estudio, la R1 fue la única región que mostró un efecto de reducción de la polispermia. Los resultados observados en el gel indican que una proteína con M_r de 46 kDa puede ser la responsable de este efecto, ya que esta no se encuentra presente en las otras regiones. El FFp presentó una banda de 45 kDa, puede ser que ambas bandas correspondan a la misma proteína y estén relacionadas con la disminución de la polispermia.

8. CONCLUSIONES

El FFp de folículos menores y mayores de 5 mm presentó efectos similares cuando se utilizó como suplemento en el medio de maduración.

El FFp con gonadotropinas y EGF mostró un efecto sinérgico ya que incrementó la maduración nuclear y citoplásmica, la eficiencia de la fertilización y la polispermia.

El FFp sin gonadotropinas y sin EGF redujo la polispermia.

La R1, que comprendió las fracciones más básicas en el cromatograma, incrementó la maduración, la fertilización y disminuyó la polispermia.

La R2, tuvo un efecto similar a la R1 en la maduración citoplásmica.

La R3, situada en la parte intermedia del cromatograma, tuvo un efecto inhibitorio en la maduración nuclear y citoplásmica.

La R4, al igual que la R3 mostró un efecto inhibitorio en la maduración e incrementó la eficiencia de la fertilización de los ovocitos que maduraron de manera espontánea.

La R5, que abarcó las fracciones más acídicas del cromatograma, presentó un efecto positivo en el rompimiento de la VG y favoreció la maduración nuclear y citoplásmica.

Las fracciones que tuvieron los efectos más importantes fueron la R1, R3 y R5.

La R1 y el FFp presentaron una banda proteínica de 45-46 kDa que podría estar relacionada con la disminución de la polispermia.

La R3 y la R4 tuvieron dos bandas de 71 y 19 kDa que podrían estar implicadas con la inhibición de la maduración.

La R5 al igual que el FFp presentó dos bandas de 139 y 124 kDa que posiblemente pueden estar relacionadas con el rompimiento de la VG.

9. PERSPECTIVAS

Aun se desconoce a qué proteínas específicas pueden corresponder las bandas que se presentaron en las cinco regiones del FFp, por lo que se requiere hacer un análisis de secuenciación y de espectrometría de masas para identificar las proteínas presentes en las regiones del FFp que tuvieron efecto en la maduración y la disminución de la polispermia.

Una vez identificadas y aisladas se deberán probar en los medios de maduración para verificar si su efecto es el mismo que se observó en la MIV, FIV y polispermia.

Si los resultados son los deseados, se propone desarrollar medios definidos que contengan únicamente los componentes que favorezcan las condiciones de maduración y fertilización, para que con esto se incremente el número de cigotos monospermicos. En estos se podrán aplicar las técnicas requeridas para la producción de cerdos transgénicos que proporcionen proteínas de uso biofarmacéutico, tejidos u órganos para xenotrasplantes. Además, es importante el desarrollo de sistemas de MIV que sean confiables, para que ayuden a estudiar y comprender las bases moleculares de los mecanismos que promueven la maduración nuclear y citoplásmica, la fertilización y la polispermia en los ovocitos porcinos.

10. REFERENCIAS

- Abeydeera LR, Day BN. (1997) Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biol Reprod*, 57: 729-734.
- Abeydeera LR, Funahashi H, Kim H, B.N. D. (1997) Chlorotetracycline fluorescence patterns and *in vitro* fertilization of frozen-thawed boar spermatozoa incubated under various bicarbonate concentrations. *Zygote*, 5: 117-125.
- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather RS, Day BN. (1998a) Presence of beta-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 50: 747-756.
- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Day BN. (1998b) Coculture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after *in vitro* fertilization: relevance to intracellular glutathione. *Biol Reprod*, 58: 213-218.
- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Prather RS, Day BN. (1998c) Presence of epidermal growth factor during *in vitro* maturation pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Mol Reprod Dev*, 51: 395-401.
- Abeydeera LR, Wang WH, Prather RS, Day BN. (1998d) Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Biol Reprod*, 58: 1316-1320.
- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Murphy CN. (2000) Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology*, 54: 787-797.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (1994) *The Molecular Biology of the Cell*. Nueva York: Garland Pub., 1011-1035.

Arici A, Oral E, Bahtiyar O, Engin O, Seli E, Jones EE. (1997) Leukemia inhibitory factor expression in human follicular fluid and ovarian cells. *Hum Reprod*, 12: 1233-1239.

Austin CR. (1982) Fertilización. En: R. AC, Short RV (eds), *Células germinales y fertilización*. México, D.F.: La Prensa Médica Mexicana , S.A. de C.V, 107-138.

Baker TG. (1982) Oogénesis y ovulación. En: R. AC, Short RV (eds), *Células germinales y ovulación*. México, D.F.: La Prensa Médica Mexicana , S.A. de C.V., 15-47.

Bearden HJ, Fuquay JW. (1982) Reproducción animal aplicada. México, D.F.: El Manual Moderno, S.A. de C.V., 73-81.

Betancourt M, Fierro R, Ambriz D. (1993) *In vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, 40: 1155-1160.

Betancourt M, Casas E, Bonilla E, Ducolomb Y. (2003) Maduración de gamentos y fertilización. En: Jiménez LF, Merchant H (eds), *Biología Celular y Molecular*. México: Prentice Hall, 679-711.

Betthausen J, Forsberg E, Augenstein M, Childs L, Eilertsen K, Enos J, Forsythe T, Golueke P, Jurgella G, Koppang R, Lesmeister T, Mallon K, Mell G, Misica P, Pace M, Pfister-Genskow M, Strelchenko N, Voelker G, Watt S, Thomson S, Bishop M. (2000) Production of cloned pigs from *in vitro* systems. *Nat Biotechnol*, 18: 1055-1059.

Bisseling J, Knapen M, Goverde H, Mulder T, Peters W, Willemsen W, Thomas C, Steegers E. (1997) Glutathione S-transferases in human ovarian follicular fluid. *Fertil Steril*, 68: 907-911.

Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. (1982) Normal development following of *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod*, 27: 147-158.

Bremel RD, Homan EJ, Howard TH. (2001) Current and future promises of transgenesis for agricultural livestock in a global marketplace. *J Dairy Sci*, 84: E1-E8.

- Brüssow KP, Rátky J, Schneider F, Torner H, Solti L. (1999a) Effects of follicular fluid on the transport of porcine oocytes into the oviduct at ovulation. *Reprod Dom Anim*, 34: 423-429.
- Brüssow KP, Rátky J, Torner H, Sarlós P, Solti L. (1999b) Contribution of porcine follicular fluid in the process of fertilization *in vivo*. *Reprod Dom Anim*, 34.
- Brüssow KP, Rátky J, Torner H, Egerszegi I, Schneider F, Solti L. (2002) Follicular and oocyte development in gilts of different age. *Acta Vet Hung*, 50: 101-110.
- Büscher U, Chen FCK, Kentenich H, Schmiady H. (1999) Cytokines in the follicular fluid of stimulated and non-stimulated human ovaries; is ovulation a suppressed inflammatory reaction? *Hum Reprod*, 14: 162-166.
- Calderon I, Healy D. (1993) Endocrinology of IVF. En: Trounson A, Gardner DK (eds), *Handbook of in vitro fertilization*. Boca Raton: CRC Press, 1-17.
- Carolan C, Lonergan P, Monget P, Monniaux D, Mermillod P. (1996) Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*, 43: 477-483.
- Casas E, Betancourt M, Bonilla E, Ducolomb Y, Zayas H, Trejo R. (1999) Changes in cyclin B localisation during pig oocyte *in vitro* maturation. *Zygote*, 7: 21-26.
- Castilla SL, Cravioto J. (1991) *Estadística simplificada. Para la investigación en ciencias de la salud*. México.: Trillas, 438.
- Chang MC. (1959) Fertilization of rabbit ova *in vitro*. *Nature*, 184: 466-467.
- Cheng WTG, Polge C, Moor RM. (1986) *In vitro* fertilization and development on farm animal oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. *Proc Symp Develop Appl Biotechnol Agr*: 73-83.
- Chi HJ, Kim DH, Koo JJ, Chang SS. (1998) The suitability and efficiency of human follicular fluid as a protein supplement in human *in vitro* fertilization programs. *Fertil Steril*, 70: 871-877.

- Choi YH, Takagi M, Kamishita H, Wijayaguanawardane MPB, Acosta TJ, Miyasawa K, Sato K. (1998) Effect of follicular fluid on fertilization and embryonic development of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 49: 1103-1112.
- Coy P, Ruiz S, Romar R, Campos I, Gadea J. (1999) Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different systems. *Theriogenology*, 51: 799-812.
- Daen PF, Sato E, Naito K, Toyoda Y. (1994) The effect of pig follicular fluid fractions on cumulus expansion and male pronucleus formation in porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J Reprod Fertil*, 101: 667-673.
- Dell'Aquila ME, Cho YS, Minoia P, Traina V, Lacalandra GM, Maritato F. (1997) Effects of follicular fluid supplementation of *in vitro* maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 12: 2766-2772.
- Ding J, Foxcroft GR. (1994) FSH-stimulated follicular secretions enhance oocyte maturation in pigs. *Theriogenology*, 41: 1473-1481.
- Dode MAN, Graves C. (2002) Involvement of steroid hormones on *in vitro* maturation of pig oocytes. *Theriogenology*, 57: 811-821.
- Dode MAN, Graves C. (2003) Role of estradiol -17 β on nuclear and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Anim Reprod Sci*, 78: 99-110.
- Dostál J, Pavlok A. (1996) Isolation and characterization of maturation inhibiting compound in bovine follicular fluid. *Reprod Nutr Dev*, 36: 681-690.
- Dubuc A, Sirard MA. (1995) Effect of coculturing spermatozoa with oviductal cells on the incidence of polyspermy in pig *in vitro* fertilization. *Mol Reprod Dev*, 41: 360-367.
- Ducibella T. (1996) The cortical reaction and development of activation co-competence in mammal oocytes. *Hum Reprod*, 2: 29-42.

- Ducolomb Y, Fierro R, González-Márquez H, Valdez A, Betancourt M. (2003) Effect of porcine follicular fluid on *in vitro* maturation oocytes, *in vitro* fertilization and polyspermy. *Advances in Reproduction*, 7: 1-5.
- Dunbar BS, Wardrip NJ, Hedrick JL. (1980) Isolation, physicochemical properties, and macromolecular composition of zona pellucida from porcine oocytes. *Biochem*, 2: 356-365.
- Edwards JL, Schrick FN, McCracken MD, van Amstel SR, Hopkins FM, Welborn MG, Davies CJ. (2003) Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer. *Am J Reprod Immunol*, 50: 113-123.
- Eppig JJ. (1993) Regulation of mammalian oocyte maturation. En: Adashi EY, Leung PCK (eds), *The ovary*. New York: Raven Press. Ltd, 185-208.
- Eriksen GV, Malmström A, Ulbjerg N. (1997) Human follicular fluid proteoglycans in relation to *in vitro* fertilization. *Fertil Steril*, 68: 791-797.
- Ferguson EM, Asworth CJ, Edwards SA, Hawkins N, Hepburn N, Hunter MG. (2003) Effect of different nutritional regimens before ovulation on plasma concentrations of metabolic and reproductive hormones and oocyte maturation in gilts. *Reproduction*, 126: 61-71.
- Fierro R, Bonilla E, Casas E, Jimenez I, Ducolomb Y, Betancourt M. (1994) Inhibition of pig oocyte *in vitro* fertilization by the action of components of the zona pellucida. *Theriogenology*, 42: 227-234.
- Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomelí C, Hernández M, Sciutto. (1998) Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa2 transgenic mice. *Infect Immun*, 2: 760-764.
- Fulka J, Motlik J, Lefèvre B. (1989) Las células sexuales. *Mundo Científico*, 9: 1075-1082.
- Funahashi H, Day BN. (1993a) Effect of different serum supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Theriogenology*, 39: 965-973.

- Funahashi H, Day BN. (1993b) Effect of follicular fluid at fertilization *in vitro* on sperm penetration in pig oocytes. *J Reprod Fert*, 99: 97-103.
- Funahashi H, Cantley TC, Day BN. (1994a) Different hormonal requirements of pig oocyte-cumulus complexes during maturation *in vitro*. *J Reprod Fertil*, 101: 159-165.
- Funahashi H, Stumpf TT, Terlow SL, Cantley TC, Rieke A, Day BN. (1994b) Developmental ability of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 41: 1425-1433.
- Funahashi H, Kim CH, Stumpf TT, Cantley TC, Day BN. (1996) Presence of organic osmolytes in maturation medium enhances cytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Biol Reprod*, 54: 1412-1419.
- Funahashi H, Day NB. (1997) Advances on *in vitro* production of pig embryos. *J Reprod Fert*, 52: 271-283.
- Gallardo-Ornelas L, González-Márquez H, Ducolomb Y, Casas E, Betancourt M. (2001) Influence of porcine follicular fluid protein fractions on oocyte maturation *in vitro*. *Bioquímica*, 26: 59-63.
- Garfin DE. (1990) One-Dimensional Gel Electrophoresis. En: Abelson JN, Simon MI (eds), *Methods in Enzymology*. San Diego: Academic Press, Inc., 425-459.
- Gérard N, Duchamp G, Goudet G, Bézard J, Magistrini M, Palmer E. (1998) A high-molecular-weight preovulatory stage-related protein in equine follicular fluid and granulosa cells. *Biol Reprod*, 58: 551-557.
- Ghetler Y, M.D. B-N, Kaneti H, Jaffe R, Gruber A, Fejgin M. (1990) Effect of sperm preincubation with follicular fluid on the fertilization rate in human *in vitro* fertilization. *Fertil Steril*, 54: 944-946.
- Gilbert SE. (1994) *Developmental Biology*, 4 ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc Pub, 121-159.
- González H. (1997) Réponse au stress acide chez *Streptococcus thermophilus*. Purification, identification et caractérisation d'une protéine surexprimée.,

Laboratoire des Biosciences de l'Aliment, Faculté des Sciences. Nancy, Francia: Université Henri Poincaré.

Gordon I. (1994) *In vitro* fertilization, Laboratory production of cattle embryos. Irland: CAB International University Press., 170-225.

Gruppen CG, McIlpatrick SM, Ashman RJ, Boquest AC, Armstrong DT, Nottle MB. (2003) Relationship between donor animal age, follicular fluid steroid content and oocyte developmental competence in pig. *Reprod Fert Develop*, 15: 81-87.

Guthrie DH, Garrett W. (2000) Changes in porcine oocyte germinal vesicle development as follicles approach preovulatory maturity. *Theriogenology*, 54: 389-399.

Hafez B, Hafez ESE. (2000a) Anatomía del aparato reproductor de la hembra. En: Hafez ESE, Hafez B (eds), *Reproducción e inseminación artificial en animales*. México: Mc Graw-Hill Interamericana, 13-29.

Hafez ESE, Hafez B. (2000b) Foliculogénesis, maduración del óvulo y ovulación. En: Hafez ESE, Hafez B (eds), *Reproducción e inseminación artificial en animales*. México: Mc Graw-Hill Interamericana, 70-83.

Hammadeh ME, Braembert B, Baltés S, Gregor T, Rosenbaum P, Schmidt W. (2000) Relationship between ovarian stimulation regimen and cytokine concentration in follicular fluid and their effect on fertilization and pregnancy outcome of patients undergoing ICSI program. *Am J Reprod Immunol*, 43.

Han YM, Abeydeera LR, Kim JH, Moon HB, Cabot RA, Day BN, Prather RS. (1999a) Growth retardation of inner cell mass cells in polyspermic porcine embryos produced *in vitro*. *Biol Reprod*, 60: 1110-1113.

Han YM, Abeydeera LR, Petersen AL, Kim CH, Murphy CN, Day BN. (1999b) Pronuclear location before the first division determines ploidy of polyspermic pig embryos. *Biol Reprod*, 61: 1340-1346.

Houdebine LM. (2002) Animal transgenesis: recent data and perspectives. *Biochimie*, 84: 1137-1141.

- Houdebine LM, Rival S, Pantano T, Jolivet G, Thepot D, Attal J. (2002) Transgenesis for the study and the control of lactation. *Reprod Nutr Dev*, 42: 117-125.
- Hunter RHF, Polge C. (1966) Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. *J Reprod Fert*, 12: 525-531.
- Illera MJ, Lorenzo PL, Illera JC, Petters RM. (1998) Developmental competence of immature pig oocytes under the influence of EGF, IGF-I, follicular fluid and gonadotropins during IVM-IVF processes. *Inst J Dev Biol*, 42: 1169-1172.
- Iritani A, Niwa K, Imai H. (1978) Sperm penetration *in vitro* of pig follicular oocytes matured in culture. *J Reprod Fert*, 54: 379-383.
- Iwasaki T, Kimura E, Totsukawa K. (1998) Studies on chemically defined medium for *in vitro* culture of *in vitro* and fertilized porcine oocytes. *Theriogenology*, 51: 709-720.
- Kawano Y, Narahara H, Matsui N, Nasu K, Miyamura K, Miyakawa I. (1997) Insulin-like growth factor-binding protein-1 in human follicular fluid: a marker for oocyte maturation. *Gynecol Obstet Invest*, 44: 145-148.
- Khatir H, Carolan C, Lonergan P, Mermillod P. (1997) Characterization of calf follicular fluid and its ability to support cytoplasmic maturation of cow and calf oocytes. *J Reprod Fertil*, 111: 267-275.
- Kikuchi Z, Nagai T, Motlik J, Shioya Y, Izaike Y. (1993) Effect of follicle cells on *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes. *Theriogenology*, 39: 593-599.
- Kikuchi Z, Kashiwasaki N, Noguchi J, Shimada A, Takahashi R, Hirabayashi M, Shino M, Ueda M, Kaneko H. (1999) Developmental competence of oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Biol Reprod*, 60: 336-340.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Ledwitz-Rigby F, Rigby BW, Gay VL, Stetson M, Young J, Channing CP. (1977) Inhibitory action of porcine follicular fluid upon granulosa cell luteinization *in vitro*: Assay and influence of follicular maturation. J Endocr: 175-184.

Li YH, Ma W, Li M, Hou Y, Jiao LH, Wang WH. (2003) Reduced polyspermic penetration in porcine oocytes inseminated in a new *in vitro* fertilization (IVF) system: straw IVF. Biol Reprod, 69: 1580-1585.

Lowry OH. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem, 193: 265-275.

MacKenzie DA, Hullett DA, Sollinger HW. (2003) Xenogenic transplantation of porcine islets: an overview. Transplantation, 76: 887-891.

Marchal R, Vigneron C, Perreau C, Bali-Papp A, Mermillod P. (2002) Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. Theriogenology, 57: 1523-1532.

Mattioli M, Bacci ML, Galeati G, Seren E. (1989) Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. Theriogenology, 31: 1201-1207.

Mattioli M, Bacci ML, Galeati G, Seren E. (1991) Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes *in vitro*. Theriogenology, 36: 95-105.

Mc Cauley TC, Buhi WC, Wu GM, Mao J, Caamaño JN, Didion BA, Day BN. (2003) Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization *in vitro*. Biol Reprod, 69: 828-834.

Mollnes TE, Fiane AE. (2003) Perspectives on complement in xenotransplantation. Mol Immunol, 40: 135-143.

Moor RM, Trounson AO. (1977) Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. J Reprod Fert, 49: 101-109.

Motlik J, Fulka J. (1974) Fertilization of pig follicular oocytes cultivated *in vitro*. J Reprod Fert, 36: 235-237.

- Murray JD. (1999) Genetic modification of animals in the next century. *Theriogenology*, 51: 149-159.
- Naito K, Fukuda Y, Toyoda Y. (1988) Effect of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured *in vitro*. *Gamete Res*, 21: 289-295.
- Naito K, Kosaka M, Fukuda Y, I. I, Toyota Y. (1990) Analysis of the factor(s) present in follicular fluid promoting male pronucleus formation ability of porcine follicular oocytes. *Jpn J Anim Reprod*, 36: 213-218.
- Niemann H, Reichelt B. (1993) Manipulating early pig embryos. *J Reprod Fertil Supplement*, 48: 75-94.
- Niemann H, Kues WA. (2003) Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. *Anim Reprod Sci*, 79: 291-317.
- Niemann H, Rath D, Wrenzycki C. (2003) Advances in biotechnology: new tools in future pig production for agriculture and biomedicine. *Reprod Domest Anim*, 38: 82-89.
- Niwa K. (1993) Effectiveness of *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization techniques in pigs. *J Reprod Fert*, 48: 61-73.
- Petters RM, Wells KD. (1993) Culture of pig embryos. *J Reprod Fert*, 48: 61-73.
- Planchot M, Mandelbaum J. (1990) Oocyte maturation, fertilization and embryonic growth *in vitro*. *Br Med Bull*, 46: 675-694.
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dali Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KH. (2000) Cloned pigs produced by nuclear transfer from somatic cells. *Nature*, 407: 86-90.
- Pursel VG, Pinkert CA, Miller KF, Bolt DJ, Campbell RG, Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE. (1989) Genetic engineering of livestock. *Science*, 244: 1281-1288.
- Revell S, Glossop C. (1989) A long-time ambient temperature diluent for boar semen. *Anim Prod*, 84: 579-584.

Revelli A, Soldati G, Costamagna C, Pellerey O, Aldieri E, Masobrio M, Bosia A, Ghigo D. (1999) Follicular fluid proteins stimulate nitric oxide (NO) synthesis in human sperm: a possible role for NO in acrosome reaction. *J Cell Physiol*: 85-92.

Romero-Arredondo A, Seidel GE. (1994) Effects of bovine follicular fluid on maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, 41: 383-394.

Romo S. (1993) *Biología reproductiva: avances en ganado bovino*. *Veterinaria México*, 3: 177-184.

Romo S. (1997) *In vitro* production of crossbreed cattle embryos. PhD Dissertation. College of Veterinary Medicine. Texas A&M University. College Station, Texas.

Romo S, DuColomb Y, Oden J, Wier LM, Wright JM, Kraemer DC. (2002) *In vitro* culture of *in vivo*-derived grade 3 bovine embryos increases development and quality. *Theriogenology*, 57: 526.

Seitz HM, Brackett BG, Mastroianni L. (1973) Fertilization. En: Hafez ESE, Evans TN (eds), *Human Reproduction conception and contraception*. Maryland: Harper and Row, 119-131.

Serrano H, Canchola E, García -Suárez MD. (2001) Sperm-attracting activity in follicular fluid associated to an 8.6 kDa protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 283: 782-784.

Shimada H, Kasakura S, Shiotani M, Nakamura K, Ikeuchi M, Hoshino T, Komatsu T, Ihara Y, Sohma M, Maeda Y, Masuura R, Nakamura S, Hine C, Ohkura N, Kato H. (2001) Hypocoagulable state of human preovulatory ovarian follicular fluid: role of sulfated proteoglycan and tissue factor pathway inhibitor in the fluid. *Biol Reprod*, 64: 1739-1745.

Sirard MA, Roy F, Patrick B, Mermillod P, Guilbault LA. (1995) Origin of follicular fluid added to the media during bovine IVM influences embryonic development. *Theriogenology*, 44: 85-94.

Spitzer D, Murach KF, Lottspeich F, Staudach A, Illmensee K. (1996) Different protein patterns derived from follicular fluid of mature and immature human follicles. *Hum Reprod*, 11: 798-807.

Stephens PC, Edwards RG. (1978) Birth after the re-implantation of a human embryo. *Lancet*, II: 366.

Stoscheck CM. (1990) Quantification of Protein. En: Abelson JN, Simon MI (eds), *Methods in Enzymology*. San Diego: Academic Press, Inc., 50-68.

Tesarik J. (1985) Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus ooforus, follicular fluid and ionophore A23187 in human population of proven fertilizing ability *in vitro*. *J Reprod Fert*, 74: 388.

Toyoda Y, Naito K. (1990) *In vitro* fertilization in domestic animals. En: Bavister B, Cummings J, Roldan ERS (eds), *Fertilization in mammals*. Massachusetts, 335-347.

Trounson AO, Anderiesz C, Jones G. (2001) Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence. *Reproduction*, 212: 51-75.

Tsafirri A, Channing CP. (1975) An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis *in vitro*. *Endocrinology*: 922-927.

Vatzias G, Hagen DR. (1999) Effects of porcine follicular fluid and oviduct-conditioned media on maturation and fertilization of porcine oocytes *in vitro*. *Biol Reprod*, 60: 42-48.

Wall RJ. (1996) Transgenic livestock: progress and prospects for the future. *Theriogenology*, 45: 57-68.

Wall RJ. (1997) A new lease on life for transgenic livestock. *Nat Biotechnol*, 15: 416-417.

Wang W, Niwa K. (1995) Synergetic effects of epidermal growth factor and gonadotropins on the cytoplasmic maturation of pig oocyte in a serum free medium. *Zygote*, 3: 345-350.

Wang W, Horose M, Rongfeng L, Shioya Y. (1997a) Development of the competence of bovine oocytes to release cortical granules and block polyspermy after meiotic maturation. *Develop Growth Differ*: 607-615.

- Wang WH, Abeydeera LR, Cantley TC, Day BN. (1997b) Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. *J Reprod Fertil*, 111: 101-108.
- Wang WH, Sun QY, Hosoe M, Shioya Y, Day BN. (1997c) Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biol Reprod*, 56: 1376-1382.
- Wang WH, Abeydeera LR, Prather RS, B.N. D. (1998) Morphologic comparison of ovulated and *in vitro*-matured porcine oocytes with particular reference to polyspermy after *in vitro* fertilization. *Mol Reprod Dev*, 49: 308-316.
- Wang WH, Day BN, Wu GM. (2003) How does polyspermy happen in mammalian oocytes? *Microscopy Research and Technique*, 61: 335-341.
- Wassarman PM. (1989) La fecundación en los mamíferos. *Investigación y ciencia*, 149: 48-55.
- Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. (2001) A profile of fertilization in mammals. *Nature Cell Biology*, 3: E59-E64.
- Weidle UH, Lenz H, Brem G. (1991) Genes encoding a mouse monoclonal antibody are expressed in transgenic mice, rabbits and pigs. *Gene*, 98: 185-191.
- Wildt ED. (1990) Potential applications of IVF technology for species conservation. En: Bavister B, Cummings J, Roldan ERS (eds), *Fertilization in mammals*. Massachusetts: Serono Symposia, 349-364.
- Wilmut I, Clark AJ. (1991) Basic techniques for transgenesis. *J Reprod Fertil*, 43: 265-275.
- Wilmut I, Whitelaw CB. (1994) Strategies for production of pharmaceutical proteins in milk. *Reprod Fertil Dev*, 6: 625-630.
- Xia P, Wang Z, Yang Z, Tan J, Qin P. (2001) Ultrastructural study of polyspermy during early embryo development in pigs, observed by scanning electron microscope and transmission electron microscope. *Cell Tissue Res*, 303: 271-275.

- Yanagimachi R. (1994) Mammalian fertilization. En: Knobil E, Neill JD (eds), The Physiology of Reproduction, Segunda ed. New York: Raven Press, Ltd., 189-316.
- Yanagishita M, Rodbard D, Hascall VC. (1979) Isolation and characterization of proteoglycans from porcine ovarian follicular fluid. J Biol Chem, 253: 911-920.
- Yoon KW, Shin TY, Park JI, Ro S, Lim JM, Lee BC, Hwang WS, Lee ES. (2000) Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids. Reprod Fertil Dev, 12: 133-139.
- Yoshida M, Ishizaki Y, Kawagishi H. (1990) Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. J Reprod Fert: 1-8.
- Yoshida M, Ishigaki K, Pursel VG. (1992a) Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. Mol Reprod Dev, 31: 68-71.
- Yoshida M, Ishizaki Y, Kawagishi H, Bamba K, Kojima Y. (1992b) Effects of pig follicular fluid on maturation pig oocytes *in vitro* and their subsequent fertilizing and developmental capacity *in vitro*. J Reprod Fert, 95: 481-488.
- Yoshida M, Mizoguchi Y, Ishigaki K, Kojima T, Nagai T. (1993) Birth of piglets derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. Theriogenology, 39: 1303-1311.
- Zheng YS, Sirard MA. (1992) The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes. Theriogenology, 37: 779-790.

11. ANEXOS

11.1. MEDIO TL-HEPES-PVA

Para lavado de complejos ovocito células del cúmulo antes del cultivo en medio de maduración.

Componente	PM	mM	g/1000 ml	g/2000ml	g/500ml
Na Cl	58.45	114.00	6.6633	13.3266	3.33165
KCl	74.55	3.20	0.2386	0.4772	0.1193
NaH ₂ PO ₄	120.00	0.34	0.0408	0.0816	0.0204
lactato de Na*	112.10	10.00	1.4 ml	2.8 ml	0.7 ml
MgCl ₂ . 6H ₂ O	203.30	0.50	0.1017	0.2034	0.05085
HEPES	238.30	10.00	2.3830	4.7660	1.1915
Piruvato de Na	110.00	0.20	0.0220	0.0440	0.0110
Sorbitol	182.20	12.00	2.1860	4.3720	1.0930
NaHCO ₃	84.00	2.00	0.1680	0.3360	0.084
CaCl ₂ .2H ₂ O**	147.00	2.00	0.2940	0.5880	0.147
Gentamicina			0.0250	0.0500	0.0125
Penicilina G			0.0650	0.1300	0.0325
PVA			0.1000	0.2000	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.

11.2. MEDIO PARA MADURACIÓN IN VITRO LIBRE DE PROTEÍNAS PARA OVOCITOS PORCINOS

TCM 199 Modificado

TCM 199

PVA	0.1%	
D-Glucosa	3.05 mM	0.5496 g/l
Piruvato de sodio	0.91 mM	0.1 g/l
Penicilina	75 µg/ml	
Estreptomicina	50 µg/ml	

El medio se suplementa con:

EGF	10 ng/ml
Cisteína	0.57 mM
LH	0.5 µg/ml
FSH	0.5 µg/ml

Cuando se emplea Pergonal se ponen 26 µl/ml en lugar de FSH y LH.

PREPARACION DE LAS HORMONAS LH Y FSH

LH (Sigma L 5269) 50 µg/ml. X 100

FSH (Sigma F-2293) 50 µg/ml. X 100

Pesar 0.005 g de la hormona y disolver en 10 ml de medio.

Tomar 1 ml de esta suspensión y agregar 9 ml de medio (dilución 10 X).

Hacer alícuota de 100 µl.

Conservar a -70°C

PREPARACION DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (EGF)

EGF (Sigma E 4127) en presentación de un vial con 0.1 mg.

Hacer una dilución con TCM-199 con BSA al 0.1% para tener una concentración de 100 µg/ml.

Tomar 10 µl y de esta dilución y llevar a 1000 µl con TCM-199 para obtener una concentración de 1 µg /ml.

Hacer alícuotas de 200 µl.

Conservar a -70 °C

11.3. MEDIO AMORTIGUADO CON TRIS MODIFICADO

MEDIO DE FIV

(Modified Tris-buffered medium, mTBM)

Componente	mM	g/100ml
NaCl	113.1	0.6611
KCl	3.0	0.0224
CaCl ₂ .2H ₂ O	7.5	0.1102
Tris*	20.0	0.2423
Glucosa	11.0	0.1982
Piruvato de sodio	5.0	0.0550

*TRIS Base libre cristalizada (Fisher)

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

11.4. SUPLEMENTOS DEL TBMm

TBMm PARA SEMEN FRESCO

Tomar 20 ml de TBMm

Suplementar con BSA al 0.4% (Sigma 7888) y 2.5 mM de cafeína (Sigma 4144). (0.0098g de cafeína anhidra o 0.019g de benzoato de cafeína).

Colocar en un tubo de 50 ml, cubrir con papel aluminio con orificios.

Incubar durante 24 horas.

Esterilizar por filtración y hacer las gotas en cajas de 4 pozos. Incubar 24 horas antes de realizar la FIV.

11.5. MEDIO PARA LAVADO DE ESPERMATOZOIDES DPBS

(SOLUCIÓN AMORTIGUADA CON FOSFATOS DE DULBECCO)

DPBS GIBCO BRL (11500-030)

Lot No 1015434

Presentación de 10.6 g es para la preparación de 1l con 0.1g/l de Ca Cl₂.

Para preparar Medio DPBS 1X

Verter el contenido de un sobre en agua desionizada en agitación a 15 - 30°C.

Agregar Ca Cl₂ 0.1 g/l

Añadir 100 µg/ml de penicilina y 75 µg/ml de estreptomina

Filtrar para esterilizar.

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

Un día antes de de la FIV:

Tomar 50 ml de DPBS

Agregar BSA al 0.1%

Ajustar a pH de 7.2 – 7.4 con Na OH o HCl 1N

Filtrar para esterilizar

Incubar a 39°C hasta su uso

**11.6. MEDIO NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY
(NCSU) 23**

COMPONENTE	mM	Cat.No	g/100ml	g/500ml
NaCl	108.73		0.36355	3.1775
KCl	4.78	P-5405	0.0365	0.1780
KH ₂ PO ₄	1.19	P5655	0.0162	0.0810
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.19	Mallinckrodt	0.0293	0.1465
D-glucosa	5.55	G-7021	0.1000	0.5000
Glutamina	1.00	G-5763	0.0146	0.0730
Taurina	7.00	T-7146	0.0876	0.4380
Hipotaurina	5.00	H-1384	0.0546	0.2730
NaHCO ₃	25.07	S-8875	0.2106	1.0530
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.70	C-7902	0.0250	0.1250
Penicilina G	75 µg/ml	PEN-K	0.0075	0.0375
Estreptomicina	50 µg/ml	S-6501	0.0050	0.0250

Ajustar el pH a 7.2-7.3 y esterilizar por filtración

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

Cuando se emplea como medio de desarrollo de embriones, suplementar con BSA al 0.4% (Sigma 8022), y esterilizar por filtración antes de hacer las gotas en la caja de 4 pozos.

12. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

12.1. Artículo científico

Ducolomb Y., Fierro R., González-Márquez H., Valdez A., y Betancourt M. (2003). Effect of porcine follicular fluid on *in vitro* maturation oocytes, *in vitro* fertilization and polyspermy. *Advances in Reproduction*. 7: 1-5.

Effect of porcine follicular fluid on *in vitro* maturation oocytes, *in vitro* fertilization and polyspermy

Y. Ducolomb, R. Fierro, H. González-Márquez, A. Valdez, M. Betancourt.

Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D. F.

Correspondence to: Yvonne Ducolomb. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Departamento de Ciencias de la Salud. Apartado Postal 55-535. México, D. F. MEXICO.
e-mail: fax: 52-(55) 58-04-47-27

Abstract

In vitro fertilization (IVF) has gained importance in different fields of mammalian reproduction research. One of the most frequent problems observed during IVF in pigs, is the high incidence of polyspermy associated to the state of maturation of the oocyte. The aim of this study was to compare the effect of porcine follicular fluid (pFF) obtained from small (<5mm) and large (>5mm) follicles on oocyte maturation, *in vitro* fertilization (IVF) and polyspermy. Oocytes from follicles 3-6 mm, matured with pFF from small follicle group (SFG) and large follicle group (LFG) were higher than in controls (88, 82 and 72% respectively). The difference was significantly between SFG and controls ($p<0.05$). IVF percentages were higher when pFF from both the SFG and LFG was present in the maturation medium (67 and 71%), compared to controls ($p<0.05$). None group showed statistical difference in polyspermy. This indicates that polyspermy is not influenced by pFF when it is present during *in vitro* maturation (IVM). Further studies are needed to test the effect of pFF on polyspermy when added to *in vitro* fertilization medium. The details of the mechanism whereby pig oocytes establish a functional block to polyspermy are still unclear.

Introduction

In vitro fertilization (IVF) has gained great importance in different fields of mammal reproduction research. The pig is an appropriate model for gamete recognition and interaction during fertilization and early embryo development studies. The use of porcine IVF has been increased as an alternative method to create transgenic pigs for the production of biological products and organs for xenotransplantation (Niemann/Reichelt, 1993). This model has physiological, anatomical and biochemical aspects similar to those of humans, and the organs obtained from transgenic pigs could have an application for transplants in humans.

However, some of the most frequent problems observed during IVF in pigs, are the high incidence of polyspermy (30-65%) and the low rates in blastocyst production (Han et al, 1999, Xia et al, 2001). Some *in vitro* maturation (IVM) and IVF conditions play an important role (Funahashi/Day, 1993). Different supplements such as bovine serum albumin (BSA) and porcine follicular fluid (pFF) have been used in maturation media to prevent the polyspermy problem (Funahashi/Day, 1993).

Using pFF from large ovarian follicles (>5 mm diameter) in maturation and fertilization media improves oocyte nuclear and cytoplasmic maturation, increases sperm penetration and male pronucleus formation, decreases polyspermy and promotes embryo development. An increase in IVM was obtained using frozen pFF from small (<5 mm) and medium (5-7 mm) follicles (Vatzias/Hagen, 1999). Some factors in pFF have an inhibitory effect on male pronucleus formation. (Naito et al, 1990). With the use of pFF in culture media promotes oocyte IVM, the results obtained show great variability. This may be due to variation in the size of the follicles used to obtain pFF (Carolan et al, 1996, Naito et al, 1990, Sirard et al, 1995).

The aim of this study was to analyze the effect of pFF obtained from small (<5mm) and large (>5mm) follicles on oocyte maturation, in vitro fertilization and polyspermy.

Materials / Methods

1. Collection of pFF

Follicular fluid was collected from prepubertal gilts ovaries collected at a local slaughterhouse and transported to the laboratory within 2 hours, in 0.9% NaCl at 25°C. Follicular fluid was recovered by aspiration from small and large follicles with a 18-gauge needle fixed to a 10 ml disposable syringe into a 50 ml tube. To remove oocytes, granulosa and blood cells, pFF was centrifuged (12,000 x g, 30 min, 4 °C) and then filtered through 0.8, 0.45, and 0.2 µm membrane filters and stored in liquid nitrogen until use.

2. Oocyte recovery and IVM

Unless otherwise stated, all chemicals used in this study were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). For IVM, oocytes from medium size (3-6 mm) follicles were obtained and cultured as described in (Abeydeera et al, 1998b) using a protein free culture media supplemented with 10 ng/ml EGF, 0.5 µg/ml LH and 0.5 µg/ml FSH (control group = CG). Another group was matured in medium without FSH, LH and EGF (supplement-deprived group = SDG). Two more groups were matured with all the supplements and 10% (w/v) of pFF from either small (small follicle group = SFG), or large follicles (large follicle group = LFG).

3. In Vitro Fertilization

After IVM cumulus cells were removed with 1% (w/v) hyaluronidase in TCM-199. Denuded oocytes were washed twice in maturation medium and 3 times in TBM medium, (Abeydeera/Day, 1997). For IVF, 30-35 oocytes of each experimental group were placed in 50 µl droplets of TBM medium covered with mineral oil. The plates were equilibrated in a CO₂ atmosphere at 39°C for 30 to 45 minutes before spermatozoa were added for fertilization (Abeydeera et al, 1998a, Abeydeera et al, 1998b).

The day before IVF, semen samples were obtained by the gloved hand method and transported to the laboratory in Readig diluent (Revell/Glossop, 1989). In short, semen was

diluted 1:1 in PBS supplemented with BSA, washed twice and resuspended in TBM at a final concentration of 5×10^5 cells/ml. For IVF, 50 μ l of this sperm suspension were added to 50 μ l of medium containing 30 to 40 oocytes, obtaining a final concentration of 5×10^5 cells/ml (Abeydeera et al, 1998b). Oocytes and sperm were coincubated at 39 °C for 7 hours in a 5% CO₂, humid atmosphere.

4. Assessment of Meiotic Maturation and Fertilization

After the coincubation period, sperm cells were removed by pipette aspiration and the oocytes were washed 3 times and transferred to 500 μ l droplets of fresh culture medium (NCSU-23) supplemented with 0.4 % fatty acid-free BSA, under mineral oil, but incubated for 12 hours as above (Petters/Wells, 1993). Nuclear state was evaluated by orcein-acetic acid staining and according to criteria established (Abeydeera et al, 1998b).

5. Statistical analysis

The results obtained were evaluated using Mann-Whitney's U test.

Results / Discussion

The cumulus-oocyte complexes matured in the presence of pFF were more expanded (Figure 1a) than those of CG (Figure 1b), at the end of the maturation period (Figure 1). As expected, SDG showed a lower maturation percentage (Table 1) than controls ($p < 0.05$). On the other side, both pFF-treated groups have more matured cells than controls (88% and 82% for small or large pFF, respectively). These results indicate that the pFF components from either small or large follicles promote the oocytes IVM. Our results agree with those of Vatzias/Hagen, (1999) that found an increase in maturation rates of pig oocytes when pFF was present. They found that pFF from small and medium follicles improve oocytes maturation rates only when it was used as a supplement for oocytes harvested from the same follicle category. Further studies are needed to investigate the possibility that pFF from different size classes could affect the IVM of oocytes collected from their own size.

Fertilization rates of IVM oocytes were affected by the protein source. Under our conditions, only SDG was not fertilized whereas pFF-treated were more fertilized than controls (Table 1). This could be due to the low state of maturation due to SDG. All treatments show equivalent polyspermy level (Table 1) indicating that it is not influenced by the presence of pFF in maturation media. Another study indicates that IVF pig oocytes polyspermy is low only when pFF from large follicles is present in fertilization media (Vatzias/Hagen, 1999).

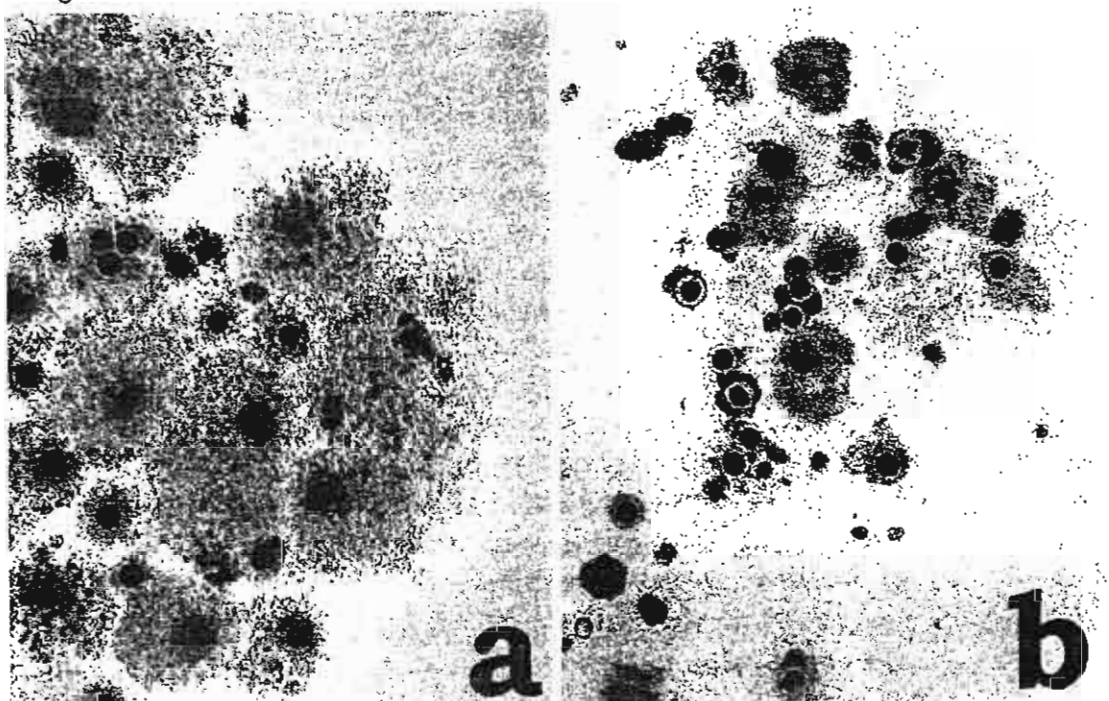
The fact that pFF in SFG treated group increased maturation and fertilization rates suggest that pFF may have promoting factors for IVM and IVF. It could be necessary to prove the effect of pFF in polyspermy when it is added to in vitro fertilization media. The details of the mechanism whereby pig oocytes establish a functional block to polyspermy are still unclear. Fractioning of pFF to identify active factors is in progress.

Table 1: Effect of pig follicular fluid during *in vitro* gamete interaction. Data are percentage \pm SD of *in vitro* maturation (IVM), *in vitro* fertilization (IVF) and polyspermy of pig oocytes incubated under the conditions described in Material and Methods. The media used contain either growth-promoting peptides (control) or follicular fluid from small (SFG) or large (LFG) follicles. As an indicator of spontaneous behavior, a supplemented deprived group (SDG) was included. Different subscripts in each column indicate statistical differences ($p < 0.05$). Data are average from at least 6 different experiments.

Treatment	Percentage \pm SD		
	IVM	IVF	Polyspermy
Control	72 \pm 15	45 \pm 21	28 \pm 15
SDG	39 \pm 2	16 \pm 6	25 \pm 16
SFG	88 \pm 13	67 \pm 19	39 \pm 21
LFG	82 \pm 12	71 \pm 9	36 \pm 15

Figure 1. Microscopy photographs. Cumulus-oocyte complexes matured with porcine follicular fluid (pFF) showed more expanded complexes (a) at the end of the maturation period than control group (CG) (b), indicating higher maturation rates.

Magnification X100.



Acknowledgments

The authors thank Eduardo Casas and Jesús Conejo for helping us to obtain the biological material and Jorge Lodigiani, for his help in preparation of the photographs. This study was partially supported by CONACYT (México).

References

- Abeydeera LR, Day BN (1997) Fertilization and subsequent development in vitro of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biol Reprod* 57:729-734
- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Prather RS, Day BN (1998a) Presence of epidermal growth factor during in vitro maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev* 51:395-401
- Abeydeera LR, Wang WH, Prather RS, Day BN. (1998b) Maturation in vitro of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development in vitro. *Biol Reprod* 58:1316-1320
- Carolan C, Lonergan P, Monget P, Monniaux D, Mermillod P. (1996) Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 43:477-483
- Funahashi H, Day BN (1993) Effects of follicular fluid at fertilization in vitro on sperm penetration in pig oocytes. *J Reprod Fertil* 99:97-103
- Han YM, Abeydeera LR, Petersen AL, Kim JH, Morphy C, Day BN et al (1999) Pronuclear location before the first cell division determines ploidy of polyspermic pig embryos. *Biol Reprod* 61:1340-1346
- Naito K, Kosaka M, Fukuda Y, Ishibashi I, Toyoda Y (1990) Analysis of the factor(s) present in follicular fluids promoting male pronucleus formation ability of porcine follicular oocytes. *Jpn J Anim Reprod* 36:213-218. 1990
- Niemann H, Reichelt B (1993) Manipulating early pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 48: 75-94
- Petters RM, Wells KD (1993) Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 48:61-73
- Revell S, Glossop C (1989) A long-time ambient temperature diluent for boar semen. *Anim Prod* 84:579-584
- Sirard MA, Roy F, Patrick B, Mermillod P, Guilbault LA (1995) Origin of the follicular fluid added to the media during bovine IVM influences embryonic development. *Theriogenology* 44:85-94
- Vatzias G, Hagen DR (1999) Effects of porcine follicular fluid and oviduct-conditioned media on maturation and fertilization of porcine oocytes in vitro. *Biol Reprod* 60:42-48
- Xia P, Wang Z, Yang Z, Tan J, Qin P (2001) Ultrastructural study of polyspermy during early embryo development in pigs, observed by scanning electron microscope and transmission electron microscope. *Cell Tissue Res* 303:271-275