



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA**

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**FERTILIZACION IN VITRO DE OVOCITOS  
DE CERDO MADURADOS IN VITRO**

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA DE LA  
REPRODUCCION ANIMAL

PRESENTA

*M. V. Z. Demetrio Alonso Ambríz García*

TUTOR

*Dr. Miguel Betancourt Rule*

MEXICO, D. F., MARZO DE 1993

6-11-95

153880

SINODALES

Dr. MIGUEL BETANCOURT RULE.

Dr. JAVIER VALENCIA MENDEZ.

Dr. ALEJANDRO REYES FUENTES.

Dr. ADOLFO ROSADO GARCIA.

M. en C. REYNA FIERRO PASTRANA.

## DEDICATORIAS

Al ejemplo de vida, justicia y coraje  
envueltos en el más tierno amor  
recibe ésto padre como un homenaje  
recibe ésto madre como una oración.

JOSE GUADALUPE Y ANA MARIA.

La esperanza que se hace verdad  
después de mucho empeño  
amada esposa es nuestra victoria  
ver realizado nuestro sueño.

GRISELDA.

Por Ustedes y para Ustedes hijitas lindas  
motor de vida e inspiración  
aquí hay parte de su esfuerzo  
sonrisas, ausencias y amor.

ALEJANDRA Y PAULINA.

Un logro que también es de Ustedes  
por su apoyo en todo momento  
sus bellas palabras de aliento  
gracias suegros, hermanos y cuñados

JOSE GUADALUPE Y JULIA.

## AGRADECIMIENTOS.

A la directora de mis primeros pasos  
en el camino de la investigación.

M en C. REYNA FIERRO.

Al extraordinario ejemplo de  
dirección y forma de trabajo  
científico, enmarcados en la virtud  
de la sencillez humana.

DR. MIGUEL BETANCOURT.

Como auténtica célula donde cada elemento  
cumple su función y da vida al conjunto,  
gracias por su ejemplo.

LABORATORIO DE BIOLOGIA CELULAR.

Al compartirme su tiempo,  
conocimientos y experiencias me  
legaron parte de su vida, gracias.

PROFESORES.

Hechos valiosos, gratas experiencias, escritos  
en una página del libro de mi vida intitulada  
UAM-Mestría, gracias.

COMPAÑEROS DE GENERACION.

MARTHA, MARCO, MARIO Y RICARDO.

Por el esfuerzo y experiencia  
aplicada en la revisión crítica del  
presente trabajo.

SINODALES.

Nadie ~~envejece~~ sólo por vivir un número de años. La gente ~~envejece únicamente al abandonar sus ideales.~~

Los ~~años~~ arrugan el rostro pero perder el entusiasmo ~~arruga el alma.~~

La preocupación, ~~la duda,~~ el egoísmo, el miedo, ~~la desesperación,~~ son ~~largos,~~ largos años que inclinan la cabeza y ~~llevan el espíritu nuevamente al polvo.~~

CICERON.

El presente ~~trabajo~~ ~~fué~~ ~~parcialmente~~ ~~financiado~~  
por el CONACYT a través del apoyo de beca no. 56767 durante el  
período comprendido entre Octubre de 1988 y Febrero de 1991.

## INDICE.

I.- INTRODUCCION .....	1
1.- MADURACION DE GAMETOS:	
- OVOCITOS .....	6
- ESPERMATOZOIDES .....	16
2.- FERTILIZACION .....	23
II.- JUSTIFICACION .....	29
III.- OBJETIVOS .....	30
IV.- MATERIAL Y METODOS .....	31
V.- RESULTADOS .....	36
VI.- DISCUSION .....	42
VII.- <del>APENDICE (MEDIOS DE CULTIVO)</del> .....	52
VIII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	57

## INTRODUCCION.

El desarrollo de técnicas de vanguardia en el campo de la reproducción, tales como la FERTILIZACION IN VITRO (FIV) y la TRANSFERENCIA DE EMBRIONES (TE) es cada vez más amplio. La FIV es un proceso que involucra la participación de ovocitos y espermatozoides con un determinado grado de madurez y a un tiempo preciso para que ocurra su adecuada interacción, logrando así la fertilización en condiciones del laboratorio.

Chang en 1959 trabajando con conejos, fue el primero en lograr la FIV en mamíferos. Desde entonces esta técnica ha sido una útil herramienta para investigaciones sobre capacitación espermática, reacción acrosomal, penetración y fertilización, empleando para ello varios modelos experimentales, entre los cuales destacan el ratón, criceto, conejo, cuyo, gato, perro, borrego, vaca e inclusive el hombre (Brackett et al, 1981; Bavister, 1990).

Las aplicaciones que ha tenido la FIV han sido en diferentes campos tales como :

Investigación Básica, donde se ha profundizado en el conocimiento de la biología de los gametos participantes tanto en el proceso de maduración como en su interacción y desarrollo temprano del embrión.

En la Producción Animal, donde es posible la utilización de hembras de elevado valor genético imposibilitadas para la



reproducción in vivo, así como la recuperación de material genético de los rastros para producir embriones de elevada calidad genética incrementando el número de animales especializados en producción de carne o leche (Yoshida, 1987; Goto, 1989; Toyoda y Naito, 1990).

En la Preservación de Especies en Peligro de Extinción, a través de la activación de ovarios de hembras con problemas de reproducción en cautiverio o de aquellas imposibilitadas para la reproducción in vivo debido a la incompatibilidad o anomalía conductual en relación a su pareja, así como para incrementar la variabilidad del acervo génico (Wildt, 1990).

En problemas de Fertilidad Humana, donde por alguna razón la fertilización in vivo no tiene éxito, es posible realizarla in vitro y posteriormente transferir el embrión resultante a la madre para que continúe su desarrollo. Así como su aplicación para análisis de cromosomas de espermatozoides después de penetrar al ovocito (Edwards et al, 1969; Bavister, 1990).

A pesar de que en cada uno de estos objetivos existen avances evidentes, el progreso y aplicación de la FIV ha sido lento, debido en parte a problemas inherentes a la técnica, dada su complejidad y costo, así como a la dificultad de interpretación de datos, por la diversidad de técnicas utilizadas por los investigadores (Austin, 1990).

En los inicios del desarrollo de la técnica, era común que se incorporaran componentes biológicos naturales a los medios de cultivo, tales como suero sanguíneo, células cúmulo o fluido folicular, con intención de conservar la viabilidad espermática y tener una adecuada capacitación, reacción acrosomal y por consecuencia eficiencia en la fertilización. Estas condiciones se han ido modificando al substituir medios de cultivo no definidos por medios definidos en los que se conoce a la mayoría de los factores con excepción de aquellos asociados a la albúmina sérica bovina. Con esta medida se ha logrado tener reproducibilidad de resultados y facilidad para la comparación de datos (Bavister, 1984; Eng et al, 1986).

La técnica de FIV se originó empleando modelos animales en particular criceto, ratón y conejo, posteriormente se hizo la adaptación exitosa a gametos y embriones humanos, continuando así su desarrollo. Desde la primera demostración de FIV en humanos llevada a cabo en 1969, hasta que se logró el desarrollo al estadio de blastocisto, sólo hubo unos años de diferencia y hacia 1978 ocurrió el primer nacimiento de un niño producto de FIV (Steptoe y Edwards, 1978).

A partir de lo anterior se produjo un auge en el desarrollo y aplicación clínica de la FIV en humanos, diferente a lo que sucedió en otras especies animales en las cuales la FIV tuvo un lento desarrollo (Hedrick, 1986).

Un gran problema al que se enfrenta esta disparidad en

el desarrollo de dicha técnica es la difícil extrapolación de datos entre especies debido a la existencia de variaciones notables como ocurre en particularidades de fertilización y desarrollo temprano del embrión. Por ejemplo, es conocido que el embrión de ratón no requiere de aminoácidos exógenos para alcanzar el estadio de blastocisto *in vitro*, pero este requerimiento es indispensable para el desarrollo del blastocisto de conejo (Wolf, 1990).

Por otra parte dada la existencia de limitantes prácticas, éticas y legales para la investigación de FIV en humanos, la alternativa seguirá siendo incrementar la investigación en modelos animales, para de ahí tomar puntos aplicables al ser humano, sirviendo esto además como un método de entrenamiento para los futuros técnicos en FIV (Wright y Bondioli, 1981; Austin, 1990; Bavister, 1990).

Un aspecto importante en la técnica de FIV es el método de maduración de ovocitos que serán fertilizados. Este puede ser *in vivo*, con o sin un tratamiento adicional para producir la hiperovulación y recuperar los ovocitos maduros en los folículos antes de la ovulación o recién ovulados en el oviducto. *In vitro* donde se recuperan ovocitos inmaduros foliculares que son sometidos a condiciones específicas de incubación y medios con hormonas para permitir que alcancen su madurez. Este método ha presentado problemas muy característicos como el que a veces algunos ovocitos no logran una maduración citoplásmica completa para permitir la descondensación adecuada del material nuclear

del espermatozoide. Sin embargo tiene la ventaja de utilizar ovocitos provenientes de ovarios obtenidos en rastros (Iritani et al, 1978; Kikuchi, 1991).

En cuanto al modelo de cerdo para FIV, ha sido usado principalmente para investigación básica sin alcanzar aún la eficiencia tal, que permita su aplicación en forma intensiva para la producción animal (Herrman y Holtz, 1981a y 1981b). Iritani et al en 1978 experimentaron por primera vez la FIV en cerdo con ovocitos madurados in vitro fertilizándolos con espermatozoides capacitados tanto in vivo como in vitro. En 1987, Yoshida demostró la posibilidad de desarrollo a término de embriones de cerdo obtenidos por FIV al lograr el nacimiento de 3 lechones.

En el Laboratorio de Biología Celular de la Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa se estudian desde hace tiempo las características de la Zona Pelúcida (ZP) de ovocitos de cerdo. Se han preparado anticuerpos tanto monoclonales como policlonales contra la ZP solubilizada y sus diferentes componentes, demostrando que tales anticuerpos, inhiben en forma parcial la unión de los espermatozoides al ovocito in vitro. Todo ello como parte de una línea de investigación que tiene por objetivo contribuir al conocimiento del proceso de fertilización y a largo plazo colaborar en el desarrollo de una vacuna anticonceptiva de uso humano. El paso siguiente es probar si los anticuerpos son capaces de inhibir la fertilización in vitro, de aquí la necesidad de contar con un sistema de FIV en el cerdo (Fierro et al, 1991; Paterson et al, 1992).

## MADURACION DE GAMETOS.

Para poder efectuar la fertilización exitosa entre un ovocito y un espermatozoide, es imprescindible que estas células lleven a cabo un proceso de maduración. Dado que tal proceso es sustancialmente diferente entre ambas células, se tratará por separado.

### MADURACION DE OVOCITOS.

En las hembras de los mamíferos, la división meiótica se inicia durante el período fetal para llegar a un estado de detenimiento conocido como dictioteno, durante la Profase I, la cual se alcanza previa al nacimiento, existiendo por tanto una dotación fija de ovocitos para toda la vida de la hembra con excepción del grupo de los lémures (Thibault, 1977; Rosado y Rosales, 1990).

Los ovocitos permanecen en dictioteno hasta que tiene lugar el desarrollo folicular durante la pubertad y de ahí hasta agotar sus células germinales. Durante este tiempo los ovocitos maduran paulatinamente, proceso que los llevará de la Profase I a la Metafase II volviéndose aptos para ser fertilizados (Gwatkin, 1977).

El proceso de maduración depende de complejas interrelaciones entre las moléculas foliculares tales como péptidos, purinas, esteroides, factores de crecimiento,

nucleótidos cíclicos y productos del metabolismo como la fosfoinositidina. Estas interrelaciones pueden establecerse con otra serie de factores aún no identificados y actuar a diferentes fases de desarrollo (Rosado y Rosales, 1991). Lo anterior es con el fin de dotar al ovocito de mecanismos que le permitan iniciar el bloqueo de la polispermia, inducir la descondensación espermática y lograr la formación del pronúcleo masculino.

El proceso de maduración del ovocito debe de efectuarse básicamente a tres niveles: nuclear, citoplasmático y membranal (Gwatkin, 1977; Downs, 1990; Ding y Foxcroft, 1992).

A nivel nuclear debe terminar la primera división meiótica y llegar hasta la Metafase II con la expulsión del primer corpúsculo polar. El núcleo del ovocito tiene un reducido papel en la reprogramación de proteínas durante su maduración siendo regulado el proceso por traducción selectiva del RNA mensajero almacenado, más que por transcripción. Los cambios membranales actúan como reguladores del substrato y en el control de la reprogramación del citoesqueleto y proteínas. A nivel citoplasmático hay cambios de señales intercelulares, reubicación estratégica de organelos, incremento en el número de gránulos corticales y en el desarrollo del factor de descondensación de cromatina del espermatozoide (Gwatkin, 1977; Downs, 1990).

Existe una relación directa entre el desarrollo folicular y el del ovocito, aunque en ocasiones los mecanismos de

crecimiento del ovocito pueden llegar a ser relativamente independientes del desarrollo folicular per se, encontrándose inclusive ovocitos con desarrollo completo en folículos pobremente desarrollados (Mangia y Canipani, 1977; Motlik y Fulka, 1986).

~~El volumen del ovocito se incrementa unas 70 veces durante su desarrollo, principalmente debido a la acumulación de material citoplásmico. Los ribosomas incrementan 8 veces su número sugiriendo así un aumento en la síntesis de proteínas. Al iniciar su desarrollo, el ovocito mide 13-18  $\mu$ m de diámetro y al final de éste alcanza aproximadamente 80  $\mu$ m aunque esto dependiendo de la especie de que se trate (Mangia y Canipani, 1977).~~

En el estado dictiado del ovocito, es característica la presencia de un núcleo prominente por lo que en este momento se le denomina "vesícula germinal" el cual ha servido como un ~~indicador de detección de ovocitos inmaduros.~~ Posteriormente ocurre el rompimiento de la vesícula germinal concluyendo la primera división meiótica, produciendo dos células hijas, una de las cuales conserva la mayor parte del citoplasma y la otra formada principalmente de material nuclear, la cual recibe el nombre de cuerpo polar. La división meiótica se detiene nuevamente en metafase II, permaneciendo así hasta que el ovocito es fertilizado o en su defecto activado partenogénicamente y llegar finalmente a una segunda división

celular produciendo el segundo cuerpo polar.

El folículo ovárico es el microambiente donde el ovocito madura, así que la interrelación que mantiene con las células foliculares es importante para la ocurrencia del fenómeno. Las células foliculares y el ovocito mantienen comunicación directa a través de prolongaciones citoplasmáticas de las células foliculares mismas que atraviesan la ZP y el espacio perivitelino para llegar al citoplasma del ovocito en donde producen un sincitio funcionando metabólicamente unidas con el ovocito siendo éste el medio para el paso de nutrientes, iones e información a través de segundos mensajeros como el AMPc (Gwatkin, 1977; Downs, 1990; Ding y Foxcroft, 1992).

Por medio de las uniones comunicantes así como por mensajeros químicos acumulados en el líquido folicular, las células foliculares ejercen una influencia inhibitoria en el mantenimiento del ovocito en el estado de dictioteno (Tsafiri y Channing, 1975a).

Las células cúmulo van experimentando cambios morfológicos conforme va madurando el ovocito. Entre las células hay presencia de moco, producido por ellas una vez activadas por las gonadotropinas o por otros agentes que incrementan los niveles intercelulares de AMPc. La mayor cantidad de moco se produce durante la máxima concentración de la hormona luteinizante (LH) y la ovulación, con lo que el ovocito adquiere un aspecto característico conocido como "expansión de las células cúmulo" el cual tiene por función hacer eficiente el



~~movimiento ciliar al paso del óvulo por el oviducto. Esta expansión también se ha descrito en ovocitos madurados in vitro como un signo del proceso de maduración (Phillips et al, 1990).~~

~~Las células cúmulo contienen numerosos ribosomas, retículo endoplásmico liso, aparato de Golgi prominente, presencia de depósitos grasos, y secreción de esteroides. En su matriz se ha detectado ácido hialurónico y glicoproteínas (Phillips et al, 1990).~~

~~El papel de las células cúmulo es contribuir a la maduración del ovocito y prevenir el endurecimiento de la ZP. También ayudan a conservar los niveles elevados de AMPc en el ovocito para continuar el detenimiento meiótico, retardando el rompimiento de la vesícula germinal. Sin embargo una vez que la maduración se ha iniciado las células cúmulo aceleran este proceso. La adición de suero a los medios de cultivo in vitro ha incrementado la eficiencia en el proceso de maduración (Tsafiri et al, 1975b; Thibault, 1977; Vanderhyden y Armstrong, 1989).~~

~~El detenimiento en el proceso de la división meiótica ha sido ampliamente estudiado, por lo que se acepta actualmente que el AMPc está directamente implicado en el control de la meiosis, sin embargo queda por definir cómo son regulados sus niveles y qué moléculas del ciclo celular son fosforiladas por acción de proteínas cinasas.~~

Los niveles elevados de AMPc en el ovocito, impiden la transición de la fase G2 a Mitosis, paso que es facilitado por una proteína cinasa de 34 KDa así como de otras proteínas como las ciclinas (Cran y Moor, 1990). Si se mantienen *in vitro* ovocitos detenidos en meiosis y son microinyectados con la subunidad catalítica AMPc dependiente de proteína cinasas, se induce el rompimiento de la vesícula germinal, por lo que se cree que una proteína desfosforiladora actúa en ese proceso.

Eppig y colaboradores en 1983, probaron diferentes concentraciones de un análogo de AMPc sobre la maduración de ovocitos en presencia y ausencia de células cúmulo, siendo mayor el efecto inhibitorio del análogo del AMPc en los ovocitos con células cúmulo, concluyendo que existe un factor inhibitor en las células cúmulo para la maduración del ovocito que es activado por AMPc y transferido al ovocito a través de las uniones comunicantes. Es probable que sea el mismo AMPc el que se transfiera al ovocito.

Por otra parte, también existen factores inhibidores de maduración del ovocito en el líquido folicular, demostrado por Chang en 1955 (citado por Downs, 1990), cuando reportó que la maduración espontánea de ovocitos de conejo *in vitro*, se suprimía si eran expuestos al fluido folicular. Se han caracterizado parcialmente dos inhibidores en el fluido folicular porcino que son dos moléculas pequeñas de 1 y 2 KDa. La primera se ha identificado como hipoxantina (Downs, 1990). Además, en el fluido folicular se encuentran otras pirimidinas, bases púricas y

nucleósidos que muestran efecto inhibitorio sobre la maduración del ovocito en presencia de AMPc, siendo las derivadas guanil las más potentes. Las pirimidinas presentes tienen poco efecto en la maduración (Downs, 1990).

Otra función del líquido folicular, es durante la diferenciación de la capacidad esteroidogénica de las células foliculares. El líquido folicular es producido por células de la granulosa y en parte por transudado sérico. La lámina basal del folículo impide el paso de moléculas con peso de 80 KDa o más, mientras aquéllas con menos de 65 KDa entran libremente. Las que pesan de 65 a 80 KDa se encuentran en concentración inversamente proporcional a su tamaño (Chang et al, 1978).

El proceso de maduración del ovocito ocurre con una marcada influencia hormonal. La LH modifica los niveles de AMPc del ovocito y células foliculares. En el ovocito disminuye sus concentraciones y en las células foliculares aumenta su producción (Younis et al, 1989).

Los efectos de la hormona folículo estimulante (FSH) sobre células foliculares, incluyen un aumento en la síntesis o actividad de la 3-beta-ol-deshidrogenasa y de la aromatasa de células de la granulosa, una activación del sistema de la adenilato ciclasa con incremento en la producción de AMPc y estimulación en la síntesis de receptores en células de la granulosa. (Greenwald y Terranova, 1988).

En las cerdas los receptores a LH se incrementan de 300 en folículos pequeños a 10,000 en folículos grandes preovulatorios, lo que prepara la luteinización de las células de la granulosa como respuesta a una máxima concentración de LH (Chang et al, 1978).

Tanto la FSH como la LH modifican las vías metabólicas de las células cúmulo hacia la formación de piruvato y lactato, además de incrementar la producción de progesterona y glicoproteínas (Thibault, 1977). A la LH se le atribuye la estimulación del AMPc dependiente de una proteína cinasa (Dekel et al, 1990).

Desde 1935, en que Pincus y Enzmann demostraron que ovocitos de conejos aislados y cultivados *in vitro* maduraban espontáneamente se ha utilizado este modelo para estudiar los mecanismos de maduración nuclear, citoplasmática y membranal, estableciendo que ovocitos preovulatorios o de folículos antrales pequeños, llegan a alcanzar la meiosis espontáneamente cuando son aislados en un medio apropiado sin requerir hormonas. Esta maduración nuclear en ovocitos no es folículo dependiente (Thibault, 1977).

El problema de la maduración nuclear espontánea, es que en caso de ocurrir fertilización, la descondensación del núcleo del espermatozoide no se da, y en caso de ocurrir, se presenta en forma retardada, por lo que el desarrollo embrionario no continúa

(Thibault, 1977), lo que indica que hay fallas en la maduración citoplasmática. Por lo anterior se ha tratado de mimetizar in vitro la influencia hormonal folicular en el período previo a la ovulación con las hormonas 17- $\beta$  Estradiol y 17-hidroxiprogesterona.

Se ha sugerido que durante el rompimiento de la vesícula germinal ocurre la liberación de algún factor nuclear o inducción de cambios citoplasmáticos necesarios para el desarrollo del pronúcleo masculino (Vanderhyden y Armstrong, 1989).

Este factor de crecimiento del pronúcleo masculino se va desarrollando durante la maduración del ovocito. Las células foliculares proveen señales para la formación de este factor influenciadas a su vez por hormonas esteroides. Por otra parte el uso de medios condicionados y la adición de progesterona ayuda a mantener la integridad de las uniones comunicantes de ovocitos y células foliculares, lo que sugiere que su participación en la formación del factor de crecimiento del pronúcleo, es a través del mantenimiento de dichas uniones (Ding Y Foxcroft, 1992).

Es importante mencionar que un gran número de ovocitos nunca llegan a madurar in vivo, debido al mecanismo folicular degenerativo conocido como atresia. En el caso de mamíferos, del 77 al 99 % de los folículos totales sufrirán atresia, que sucede en cualquier etapa de crecimiento siendo más frecuente en los grandes folículos antrales. En condiciones naturales la atresia es un fenómeno paulatino e irreversible, que se

caracteriza porque las células de la granulosa tienen núcleos picnóticos así como vacuolización del citoplasma del ovocito, disminución de las microvellosidades, condensación de la zona pelúcida y su retracción hacia las células de la granulosa, disminuyen los receptores a LH, aumentan de tamaño las mitocondrias y se produce daño a otros organelos (Rosado y Rosales, 1991).

Cuando un ovocito es retirado de su ambiente folicular en un inicio del proceso atrésico, siendo transferido a un cultivo in vitro, existe la posibilidad de inhibición del proceso atrésico y recuperación del proceso de maduración (Hay et al, 1979). Desafortunadamente hasta ahora no se cuenta con algún marcador bioquímico o endócrino que indique cuáles folículos serán atrésicos, siendo quizá de gobierno exclusivamente intraovárico (Rosado y Rosales, 1991).

## MADURACION DE ESPERMATOZOIDES.

El espermatozoide adquiere la habilidad para interactuar exitosamente con el ovocito durante su tránsito por el epidídimo. Estos cambios morfológicos y fisicoquímicos se conocen como maduración. Los espermatozoides en el epidídimo proximal son poco móviles, no reconocen a la ZP y no llevan a cabo la reacción acrosomal, en contraste, los del epidídimo distal son vigorosos, móviles, se unen bien y en gran número a la ZP y presentan reacción acrosomal al contacto con esa estructura (Cummins, 1990).

El análisis bioquímico de los fluidos recuperados en el lumen epididimario muestra una gran variación en polipéptidos dependiendo de la región, sugiriendo que el espermatozoide está sujeto a diferentes fluidos luminales a través de su tránsito por ese tracto, sufriendo remodelación molecular en su superficie, así como en cargas de superficie, capacidad de unión a lectinas, distribución de moléculas intramembranales y composición de lípidos (Cummins, 1990).

Durante el proceso de maduración epididimaria ocurren modificaciones que incluyen cambios de maduración verdadera, protectivos o estabilizantes y deteriorativos o de envejecimiento. Los primeros se requieren para la fertilización, los segundos le brindarán protección durante su transporte en los tractos reproductores masculino y femenino. Los terceros ocurren como resultado durante el paso por el epidídimo o en un

almacenamiento prolongado, por ejemplo, un aumento de puentes disulfuro en la cromatina nuclear o en la cola, que estabilizan al espermatozoide pero que en exceso son indicativas de envejecimiento (Martin, 1990; Suzuki, 1990).

A pesar de que varios cambios morfológicos son obvios, su significado actual es dudoso. Uno de estos cambios ocurre en los espermatozoides de segmentos iniciales del tracto epididimario de rata que tienen un material floculento entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, el cual desaparece en segmentos epididimarios distales, con lo que ambas membranas quedan más cercanas e incluso en algunos puntos llegan a tocarse. La presencia de este material previene la reacción acrosomal en la cual las membranas se fusionan y vesicularizan en un proceso de exocitosis para ayudar a cruzar las células que rodean al ovocito, llegar a él y fusionarse con el oolema (Suzuki, 1990).

Otro cambio importante, identificado por medio de técnicas de criofractura, es el de distribución de moléculas de la membrana plasmática periacrosomal del espermatozoide. Dicho patrón de distribución se encuentra relacionado con la sección del epidídimo donde se haya tomado la muestra, siendo además característico para cada especie. Las moléculas intramembranales presentan tamaños que van desde 6 hasta 11 nm, teniendo libertad de movimiento en la membrana, por lo que en algunas porciones del epidídimo se han observado espermatozoides con grupos de moléculas membranales en un ordenamiento hexagonal el cual puede



ser estabilizado por la presencia de un glicocalix (Suzuki, 1990).

La composición de lípidos de las células espermáticas cambia durante su paso por el epidídimo. La densidad de los esteroides, principalmente colesterol y desmosterol se incrementa en la membrana plasmática periacrosomal durante su tránsito por el epidídimo considerándose que es un determinante esencial para la estabilidad y permeabilidad de la membrana, llegándose a sugerir con base en estudios bioquímicos, que la liberación de colesterol membranar posterior, es clave importante para la serie de eventos de capacitación que preceden a la reacción acrosomal. Las macromoléculas que median el flujo de colesterol, están presentes en el tracto reproductor femenino. Se sugiere incluso que esta inestabilidad membranar facilita la exocitosis acrosomal (Suzuki, 1990).

Los fosfolípidos constituyen cerca del 60-75 % de lípidos totales en el espermatozoide, siendo importantes en los procesos de modificación de fluidez de las membranas, propiedades fusogénicas, modulación de  $Ca^{++}$ ATPasa y en el caso del ácido araquidónico como substrato en la generación de eicosanoicos (Roldán y Harrison, 1990).

El espermatozoide abandona al testículo con un determinado complemento de proteínas en su superficie que se modifica a través de su tráfico por los tractos reproductores masculino y femenino y dado que el espermatozoide no tiene

síntesis activa de proteínas, su composición superficial no puede ser alterada por las vías usuales de nueva síntesis e inserción, por lo que debe existir un recambio de proteínas con el medio (Roldán y Harrison, 1990).

Algunas moléculas que se encuentran en el tracto reproductor pueden actuar modificando al complemento proteico de superficie proporcionando una fuente de nuevas proteínas que se unan o puedan insertarse en la superficie del espermatozoide. Alternativamente pueden ocurrir modificaciones en proteínas existentes como resultado del contacto con los fluidos del tracto reproductor. Otra alternativa, es el almacenamiento interno de proteínas que el espermatozoide pudiera transportar posteriormente a su superficie.

Saxena et al. en 1986, empleando anticuerpos monoclonales contra proteínas membranales del espermatozoide tanto eyaculados como de cola de epidídimo, encontraron que una proteína denominada 5, migraba de la cabeza hacia el flagelo durante la capacitación, efecto que revertía si se agregaba líquido seminal o cuando se inhibía el metabolismo energético por azida. La citocalacina B, inhibidor de polimerización de actinas, también previno el movimiento de esta proteína. Los cambios detectados en la capacitación fueron dependientes del tiempo. Las proteínas mostraban una localización más uniforme en espermatozoides de la cola epididimaria que los de cabeza.

Por otra parte conforme el espermatozoide va adquiriendo madurez en su tráfico por el epidídimo va modificándose su patrón de movimiento. En estudios realizados en carneros a través de cánulas testiculares se pudo establecer que los espermatozoides de la "rete testis" tienen escaso movimiento, sin embargo los espermatozoides eyaculados tiene un patrón de movimiento muy activo. En forma adicional a lo anterior existe, un mecanismo de hiperactivación espermática, el cual ocurre en el tracto reproductor femenino, mecanismo que se puede reproducir in vitro siendo el cambio más evidente, la amplitud de la onda del movimiento flagelar debido a la flexibilidad incrementada en la región media del espermatozoide (Ishijima, 1990).

Los espermatozoides tanto testiculares como de cabeza del epidídimo que fueron sometidos a eliminación de la membrana plasmática y posteriormente reactivados con ATP, tuvieron movimientos similares a los mostrados por los espermatozoides de la cola del epidídimo no tratados, aunque con menor frecuencia y amplitud. Con esto se comprueba que la capacidad de movimiento existe en ambos, aunque los espermatozoides inmaduros con su membrana plasmática intacta, poseen mecanismos que previenen la expresión de la actividad motil (Ishijima, 1990).

La frecuencia y forma del batimiento de la cola del espermatozoide se regulan independientemente. El AMPc tiene un papel muy importante para el inicio de la motilidad

espermática a dosis de 100  $\mu$ M o más, incrementa la amplitud de movimientos de oleaje en espermatozoides reactivados de criceto, y aumenta la flexibilidad del flagelo en su pieza media, sin cambios en la frecuencia de batimiento (Ishijima, 1990). Se sugiere que el calcio y AMPc son capaces de regular el movimiento de ondas de los espermatozoides de mamíferos e incluso que tienen un importante papel en la hiperactivación. La capacidad de movimiento flagelar activo es inherente a la competencia funcional, siendo necesaria para el tráfico exitoso por el tracto genital femenino hasta el oolema (Olds, 1990).

Austin y Chang en 1951 reportaron que los espermatozoides de mamíferos son incapaces de fertilizar cuando son eyaculados y que adquieren esa habilidad después de estar un tiempo en el aparato reproductor femenino. Al año siguiente Austin denominó a este fenómeno "capacitación", que designaba el paso de un espermatozoide completo pero no funcional a un estado fertilizante, dada su capacidad para penetrar la ZP y fusionarse con el ovocito (Fraser, 1990). Es claro entonces que el espermatozoide debe de adquirir dos funciones muy importantes: la hiperactividad y llevar a cabo la reacción acrosomal.

En ambos procesos el calcio juega un papel primordial. Todas las especies de mamíferos estudiados requieren el calcio extracelular hacia el fin de la capacitación para poder efectuar la reacción acrosomal y adquirir la motilidad hiperactiva. La modulación del flujo de calcio por la  $Ca^{++}$

ATPasa y/o  $\text{Na}^{++}/\text{Ca}^{++}$  intercambiadoras, puede afectarse por la presencia de moléculas de la membrana plasmática, al momento de la eyaculación. Por ejemplo espermatozoides epididimarios de toro, rápidamente acumulan calcio, mientras que los eyaculados no lo hacen, sugiriendo que el contacto con el plasma seminal altera esta función. Del plasma seminal de bovino se aisló una proteína llamada caltrina que previene o retarda la acumulación de calcio extracelular del espermatozoide eyaculado. Se caracterizó como un polipéptido de 9,600-10,500 Da. Su punto isoeléctrico es de 8.3, lo que indica una composición de aminoácidos rica en residuos básicos y se presume que no contiene carbohidratos. Durante la capacitación, la pérdida de estas moléculas inhibitoras puede permitir el aumento del calcio intracelular hasta niveles críticos para efectuar la reacción acrosomal. Estos fueron los factores descapacitantes reconocidos por Chang con actividad reversible. Algunos derivan del plasma seminal y otros del plasma epididimario (Rufo, 1981; Roldán y Harrison, 1990).

Por otra parte la interacción entre moléculas efectoras asociadas con la ZP y otros elementos del complejo ovocito-células cúmulo y canales de calcio para promoción de la capacitación espermática, estimulan el influjo de calcio al espermatozoide el cual puede disparar la reacción acrosomal (Roldán y Harrison, 1990).

## FERTILIZACION.

Cuando un ovocito y un espermatozoide interactúan con éxito llevando a cabo la fertilización, sus núcleos respectivos se unen, aportando cada uno la mitad del total de la dotación de cromosomas, iniciando así el desarrollo de un nuevo individuo. De no establecerse la interacción, las células morirán al cabo de unas pocas horas o a lo sumo pocos días, por ello es que los organismos coordinan sus actividades fisiológicas y de comportamiento a fin de asegurar la proximidad de sus gametos en el momento más oportuno para la fertilización (Epel, 1977).

El evento de la fertilización fué observado por primera vez bajo un microscopio por el zoólogo suizo Hermann Fol en 1877 utilizando para ello gametos de estrella de mar y así aportó un conocimiento que ponía fin a siglos de especulación que al respecto se manejaba (Epel, 1977).

El paso inicial para que ocurra la fertilización es el reconocimiento o unión del espermatozoide al ovocito. Dicha unión establecida entre la membrana plasmática acrosomal y la ZP es mediada por receptores especie específicos presentes en la ZP. En el ratón se ha caracterizado este receptor al cual se le denominó ZP3 con un peso molecular de 83 KDa; éste consta de una cadena de polipéptidos de 44 KDa de peso con puentes de asparagina, serina-treonina así como cadenas de oligosacáridos unidos covalentemente. Cada ZP contiene aproximadamente un billón de

copias de ZP3 que son sintetizadas junto con otras glicoproteínas de 200 KDa (ZP1) y de 120 KDa (ZP2). Las 3 glicoproteínas presentan un arreglo de malla teniendo ésta un tamaño de poro de aproximadamente 7  $\mu\text{m}$  y dispuesta alrededor del ovocito (Wassarman, 1987). Cada espermatozoide se une a decenas de miles de copias de ZP3 por el margen exterior a la ZP, siendo las moléculas de unión los oligosacáridos de la ZP3 de 3.5 KDa. Por otro lado ZP1 y ZP2 también tienen cadenas de oligosacáridos pero los espermatozoides no se unen a ellos (Huang y Yanagimachi, 1982; Wassarman, 1987).

Al principio la unión es débil y no específica pero posteriormente es más estable, fuerte y específica. Es importante la orientación mutua que adquieren los gametos durante esta unión pues de aquí deriva si continúa o no la interacción entre ellos (Epel, 1977; Naito *et al.*, 1992).

Por otro lado, rodeando la cabeza del espermatozoide y asociadas a la membrana plasmática existen diferentes proteínas cuya función es la de unirse a la ZP tales como lectinas, glicosiltransferasas, proteinasas y glicosidasas. Es probable que la galactosiltransferasa reconozca y se una a residuos específicos de N-acetilglucosamina de la ZP3 formando de un complejo enzima-substrato en el cual ZP3 sirve como substrato. Los espermatozoides unidos llevan a cabo la reacción acrosomal como preparación a su penetración a través de la ZP y fusión con la membrana plasmática del ovocito (Wassarman, 1987).

Debido a que el espermatozoide completa la reacción acrosomal después de la unión con la ZP, los mismos componentes de la ZP deben inducir la reacción. Dicha función parece residir en ZP3 en la cadena de polipéptidos, de forma que el espermatozoide se une inicialmente a la ZP por los oligosacáridos y glicopéptidos y posteriormente se induce la reacción acrosomal por los polipéptidos (Huang y Yanagimachi, 1982; Wassarman, 1987).

El acrosoma es un organelo lisosomal que aparece durante la transformación de espermátidas a espermatozoides como producto del complejo de Golgi, contiene enzimas como proteinasas, glicosidasas, fosfatasas, arilsulfatasas y fosfolipasas, siendo componentes de la membrana acrosomal interna. Con la reacción acrosomal se induce la fusión y vesicularización de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa, liberación del contenido del acrosoma y exposición de la membrana acrosomal interna. Esta reacción se caracteriza por un influjo de sodio y calcio y eflujo de hidrógeno a través de la membrana plasmática que rodea la cabeza del espermatozoide, posteriormente actúa una bomba de adenosín-5-trifosfato dependiente de hidrógeno lo que permite un incremento en el pH intracelular. Existe un importante requerimiento de calcio así como de la proteína que lo une, la calmodulina, presente en la región de la cabeza del espermatozoide entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa (Wassarman, 1987).



Después de la reacción acrosomal, el espermatozoide puede penetrar la ZP a través de una proteólisis limitada por acción de la acrosina, la cual es producida por proteólisis específica de una proenzima inactivada llamada proacrosina, que puede estar íntimamente relacionada con la membrana acrosomal interna. El espermatozoide cruza la ZP a una velocidad de 1  $\mu\text{m}$  por minuto haciendo una pequeña perforación del grosor equivalente al diámetro de la cabeza del espermatozoide (Wassarman, 1987).

Ya en el espacio perivitelino el espermatozoide hace contacto con el ovocito, al cual se adhiere y se fusiona para fertilizarlo (Wassarman, 1987; Yanagimachi, 1988). La membrana plasmática de la región posterior de la cabeza, en el segmento ecuatorial es la que se fusiona con la membrana plasmática del ovocito. Aparentemente después de la reacción acrosomal, la membrana plasmática que permanece asociada a la cabeza del espermatozoide, sufre cambios que le permitirán fusionarse con otras membranas. (Wassarman, 1987; Yanagimachi, 1988)

Se ha propuesto que para lograr la fusión, es necesaria la deshidratación localizada en el sitio de contacto de membranas, así como el establecimiento de interacciones hidrofóbicas. Posteriormente los microvilli se elongan y enclaustran la cabeza del espermatozoide, luego se acortan e internalizan al espermatozoide en el citoplasma del ovocito. Dado que la motilidad del flagelo del espermatozoide cesa al momento

de la fusión, la fuerza para internalización del espermatozoide fusionado proviene de una región del citoplasma cerca de la membrana plasmática de 2  $\mu\text{m}$  de grosor, llamada corteza del ovocito, donde se ha reportado la existencia de las proteínas contráctiles actina y miosina (Wassarman, 1987; Yanagimachi, 1988).

Los cambios que ocurren a continuación, están orientados a evitar la penetración de más espermatozoides al ovocito, pues conduciría a la letal condición de la polispermia. Se han reportado cambios a sólo unos segundos después de ocurrida la fertilización que incluyen modificaciones en el potencial de membrana del ovocito, y posteriormente se presenta la reacción cortical y reacción de zona (Wassarman, 1989, Hatanaka *et al*, 1992; Naito *et al*, 1992).

Los gránulos corticales que aparecen durante el crecimiento del ovocito como productos del complejo de Golgi, están ubicados en la región de la corteza del ovocito. Durante la reacción cortical ocurre una fusión entre la membrana plasmática del ovocito y la de los gránulos corticales. Dicha fusión se propaga como una onda comenzando en el punto de unión de los dos gametos y continuando hacia la periferia del ovocito. Aparentemente la liberación de calcio de las reservas citoplásmicas es responsable de la propagación de la onda. Con esto también ocurre un incremento en el área de superficie del ovocito, caracterizado primeramente por elongación de los miles de microvilli y tal vez una reordenación de la membrana

plasmática (Wassarman, 1987; Yanagimachi, 1988).

Las enzimas hidrolíticas de los gránulos, tales como proteinasas y peroxidasas, atraviesan los poros de la ZP modificando su constitución, esto es, induciendo la reacción de zona, que se manifiesta por endurecimiento de la ZP e inactivación de los sitios receptores a espermatozoides lo que detiene el paso de aquellos que estén cruzando la ZP en ese momento, todo ello para evitar aún más la posibilidad de polispermia y proveer una capa protectora para el cigoto y embrión temprano (Wassarman, 1987; Yanagimachi, 1988, Hatanaka et al, 1992).

Antes de ser fecundado, el ovocito se encuentra en un estado en el que su metabolismo está detenido, la respiración, transporte y síntesis de proteínas y ARN están considerablemente reducidos, no habiendo en absoluto síntesis de ADN. Con la fertilización se produce activación general del metabolismo, dando comienzo al desarrollo embrionario. Así la función del espermatozoide se limita a poner en marcha un programa genético previamente establecido en el ovocito (Epel, 1977).

## JUSTIFICACION.

El montaje de técnicas de vanguardia en biología de la reproducción como la fertilización in vitro, abre una serie de posibilidades de estudio, caso concreto el que de aquí derivará para ~~determinar del efecto de los anticuerpos anti-zona pelúcida~~ sobre la fertilización in vitro de ovocitos de cerdo, así como futuros estudios del proceso mismo de la fertilización, ~~micromanipulación de gametos y embriones y reproducción asistida.~~

## OBJETIVOS.

### GENERAL:

Montaje de la técnica de Fertilización in vitro de ovocitos de cerdo madurados in vitro.

### ESPECIFICOS:

Control de variables como pH, osmolaridad, suplementación de medios con hormona foliculo estimulante, luteinizante y estradiol, albúmina sérica bovina, piruvato de sodio, glucosa, gentamicina, tiempo y condiciones de incubación, transporte y manejo de gametos.

~~Obtención de espermatozoides y ovocitos maduros aptos~~  
para la fertilización.

Lograr el desarrollo inicial del cigoto hasta el estadio de 4-8 células.

## MATERIAL Y METODOS.

Se emplearon las técnicas descritas por Bavister y Yanagimachi, 1977; --Bavister et al 1983 y Parrish et al 1985 con algunas modificaciones .

### MADURACION DE OVOCITOS.

Los ovarios fueron colectados en el Rastro Frigorífico y Empacadora "ABC" ubicada en Los Reyes La Paz, Estado de México. Se seleccionaron aquellos de aspecto saludable y que tuvieran folículos de entre 3 y 6 mm de diámetro, se transportaron al laboratorio en un tiempo no mayor de 2 horas en un termo con solución salina (0.157 M NaCl) a 35 °C. Una vez en el laboratorio, se lavaron dos veces con solución salina, manteniéndose en esterilidad.

La obtención de los ovocitos se llevó a cabo en la campana de flujo laminar horizontal marca VECO y consistió en puncionar los folículos con una jeringa hipodérmica plástica de 10 ml con aguja calibre 21 (Becton Dickinson) para aspirar el líquido folicular y el complejo ovocito-células cúmulo (OCC). Esta suspensión se colocó en tubos de centrífuga de policarbonato de 12 ml. Se dejó en reposo por 15 min a fin de permitir la sedimentación del OCC así como fragmentos de pared folicular. Posteriormente con sumo cuidado, se introdujo una pipeta Pasteur hasta el fondo del tubo y se aspiró

aproximadamente 1 ml del contenido, el cual se depositó lentamente en una caja Petri de vidrio de 5 cm de diámetro para la identificación y clasificación de los ovocitos colectados en un microscopio estereoscópico (ZEISS).

~~Se seleccionaron los ovocitos que poseían citoplasma color café, uniforme y rodeados de una masa considerable de células cúmulo. Una vez identificados y con ayuda de una micropipeta, los OCC se lavaron en 2 veces en gotas de 50 µl de medio de Maduración (medio 199, MICROLAB), suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado a 50 °C, 2 UI/ml de FSH y 2 UI/ml de LH (Gonadotropyl, SERONO), 1 µg/ml de estradiol (17β Estradiol, SIGMA), 1 mg/ml glucosa, 0.25 mM piruvato de sodio (BAKER), 50 µg/ml gentamicina (SCHERAMEX), ajustado todo el medio a 280-290 mOsm/kg en un osmómetro marca OSMETTE.~~

~~Se prepararon cajas de cultivo de 4 pozos de poliestireno (NUNC) con gotas de 50 µl del medio de maduración cubiertas con aceite de parafina y equilibradas durante 2 horas en la incubadora a 37°C. Se dejaron madurar de 10 a 15 OCC por gota durante 48 horas a 37°C en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>, 95 % de aire y 100 % de humedad relativa.~~

#### CAPACITACION DE ESPERMATOZOIDES.

~~El semen se obtuvo de verracos con fertilidad probada siendo una donación de la Granja Experimental Porcina de la UNAM,~~

ubicada en Zapotitlán, Tláhuac, D.F.

El semen se obtuvo por la técnica conocida como de mano enguantada. Se colectó en un termo al cual se le colocaron gasas para filtrar el semen y que no permaneciera en contacto con la fracción gelatinosa del mismo, posteriormente se llevó al laboratorio de la propia granja para su evaluación y cuantificación. De aquí se tomó una muestra de aproximadamente 10 ml, la cual se recibió en un tubo de centrífuga de policarbonato de 12 ml y se guardó en un termo para su traslado al laboratorio en un tiempo no mayor a una hora.

Se prepararon cajas de 4 pozos con 0.5 ml de medio TALP-HEPES (ver apéndice) suplementado con 1 mM de piruvato de sodio, 6 mg/ml de albúmina sérica bovina, fracción V (SIGMA de MEXICO) y 50 µg/ml de gentamicina, ajustado a 290-300 mOsm/kg y se colocaron en la incubadora durante 2 horas para que se equilibrara su temperatura.

Con una micropipeta se resuspendió el semen fresco y se colocó en pozos. La cantidad que se agregó fue de  $8 \times 10^6$  espermatozoides/ml y se incubaron durante 4 horas a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> para su capacitación.

#### FERTILIZACION IN VITRO

Una vez madurados los ovocitos con sus células cúmulo expandidas, se sacaron del medio de maduración y se lavaron dos



veces en gotas con 50  $\mu$ l de medio de fertilización TALP suplementado con 0.25 mM de piruvato de sodio, 6 mg/ml de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos y 50  $\mu$ g/ml de gentamicina, ajustando todo el medio a 280-300 mOsm/Kg. (ver apéndice).

Los lavados eran vigorosos a fin de retirar el máximo posible de células cúmulo. Posteriormente se colocaron los ovocitos en una caja de 4 pozos con gotas de 50  $\mu$ l de TALP suplementado, cubiertas con aceite de parafina, equilibrada previamente durante 2 horas en la incubadora.

Se colocaron de 10 a 15 ovocitos por gota que se inseminaron con los espermatozoides capacitados a una concentración final por microgota de  $5 \times 10^4$  espermatozoides. Se incubaron nuevamente siendo examinados a las 24, 48 y 72 horas postinseminación bajo el microscopio invertido. Algunos ovocitos sólo se dejaron en incubación las primeras 24 horas, en caso de tener todavía células cúmulo adheridas, se agitaron vigorosamente para desprenderlas. Una vez libres, se sacaron del medio TALP y se colocaron en fijador (ácido acético-metanol 1:3 v/v) permaneciendo en refrigeración por 24 horas, al cabo de las cuales se tiñeron.

La tinción consistió en colocar los ovocitos sobre un portaobjetos, se eliminó el excedente del fijador por evaporación o con papel secante, y se puso una gota de colorante (orceína acética al 1 %) durante 10 minutos. Se colocó el cubreobjetos y

eliminó el exceso de colorante por los bordes con papel secante. Por último se selló el cubreobjetos con barniz y observó al microscopio óptico.

Los ovocitos que presentaron dos pronúcleos se consideraron como fertilizados. Los ovocitos que permanecieron en incubación por períodos de 48 o 72 horas, se examinaron con microscopio de contraste de fases siendo el criterio de fertilización positivo el encontrar embriones de 2 a 8 células.

## RESULTADOS.

Se realizaron un total de 26 experimentos completos es decir desde obtención y maduración de ovocitos (Fig. 1 y 2) hasta fertilización (Fig. 3 y 4). Sólo se reportan resultados de 15 experimentos debido a que en los otros 11 no fué posible valorar la técnica principalmente por problemas de contaminación o por no contar con resultados consistentes.

En la tabla 1 se muestran resultados de 8 experimentos con embriones obtenidos por FIV a 48-72 horas después de la inseminación según el número de blastómeros contados. De un total de 204 ovocitos cultivados se obtuvieron 80 embriones (39.2%) de los cuales 62 (77.5%) eran de 2 células (Fig. 4), 9 (11.25%) de 4 y 9 (11.25%) de 8.

La eficiencia en obtención de embriones en relación a los ovocitos cultivados fué desde 10.3% (3/29) hasta 80% (20/25). En 5 de estos experimentos (62.5%) se obtuvieron exclusivamente embriones de 2 células y en los otros 3 (37.5%) de 4 y 8 células.

En la tabla 2 se muestra el estadio de desarrollo alcanzado por ovocitos a 24 horas de haber sido inseminados evaluado por tinción de acetorceína y presencia de cromosomas en metafase o de pronúcleos, lo que permitió tener

resultados en menor tiempo. Se realizaron un total de 7 experimentos en los cuales se cultivaron 144 ovocitos y se consideraron como maduros (metafase) 71 (49.3%) e inmaduros 73 (50.7%).

La eficiencia de maduración va desde 35.0% (7/20) hasta el 80% (12/15). De 71 ovocitos que maduraron 40 fueron fertilizados (56.3%). La eficiencia de fertilización fué desde 18.2% (2/11) hasta 84.6% (11/13).

Se tuvo un promedio de 5 % de ovocitos partenogenéticos.

Cabe hacer mención que a pesar de que se manejaban un promedio de 10 ovocitos por microgota es evidente que no se presentan resultados de un total de 40 ovocitos por caja de cultivo, debido a que sólo eran utilizados los que presentaban expansión de sus células cúmulo al final de la maduración (Fig. 2) y por otra parte algunos se perdían en los lavados, la fijación o la tinción.

**TABLA 1. EMBRIONES OBTENIDOS POR FIV A 48-72 hs  
POSTINSEMINACION SEGUN NUMERO DE BLASTOMEROS.**

Total de Ovocitos	Embriones			Total de Embriones (%)
	2 cel	4	8	
29	1	1	1	3 (10.3)
29	2		4	6 (20.6)
37	4			4 (10.8)
31	9			9 (29.0)
12	8			8 (66.6)
25	8	8	4	20 (80.0)
16	12			12 (75.0)
25	18			18 (72.0)
<b>TOTAL</b> 204	<b>62</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>80 (39.2)</b>

**TABLA 2. OVOCITOS A 24 hs POSTINSEMINACION  
SEGUN ESTADIO DE DESARROLLO.**

	Total Ovocitos	Estadio (%)		
		Maduros*	Inmaduros	Fertiliz**
..	19	7 (36.8)	12 (63.2)	3 (48.8)
	20	7 (35.0)	13 (65.0)	2 (28.5)
	26	12 (46.1)	14 (53.8)	6 (50.0)
	22	11 (50.0)	11 (50.0)	2 (18.2)
	15	12 (80.0)	3 (20.0)	9 (75.0)
	19	9 (47.3)	10 (52.7)	7 (77.7)
	23	13 (56.5)	10 (43.5)	11 (84.6)
<b>TOTAL</b>	<b>144</b>	<b>71 (49.3)</b>	<b>73 (50.7)</b>	<b>40 (55.3)</b>

\* También los que fueron fertilizados se consideran dentro de los maduros.

\*\* Porcentaje en relación a los madurados.

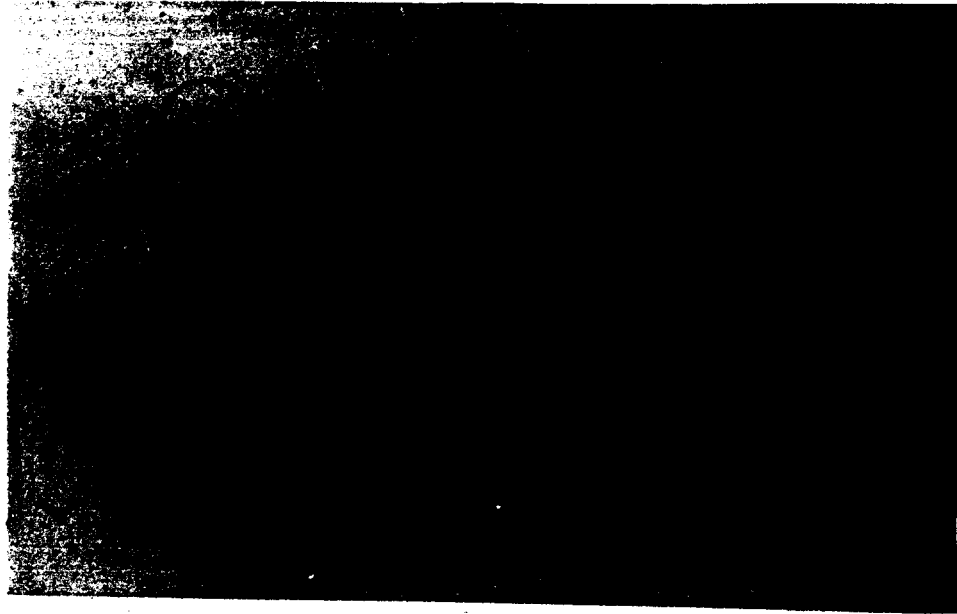


FIG. 1. OVOCITO RECIEN OBTENIDO CON ABUNDANTES  
CELULAS CUMULO.



FIG. 2. OVOCITO CON CELULAS CUMULO EXPANDIDAS DESPUES DE  
48 HORAS DE INCUBACION.

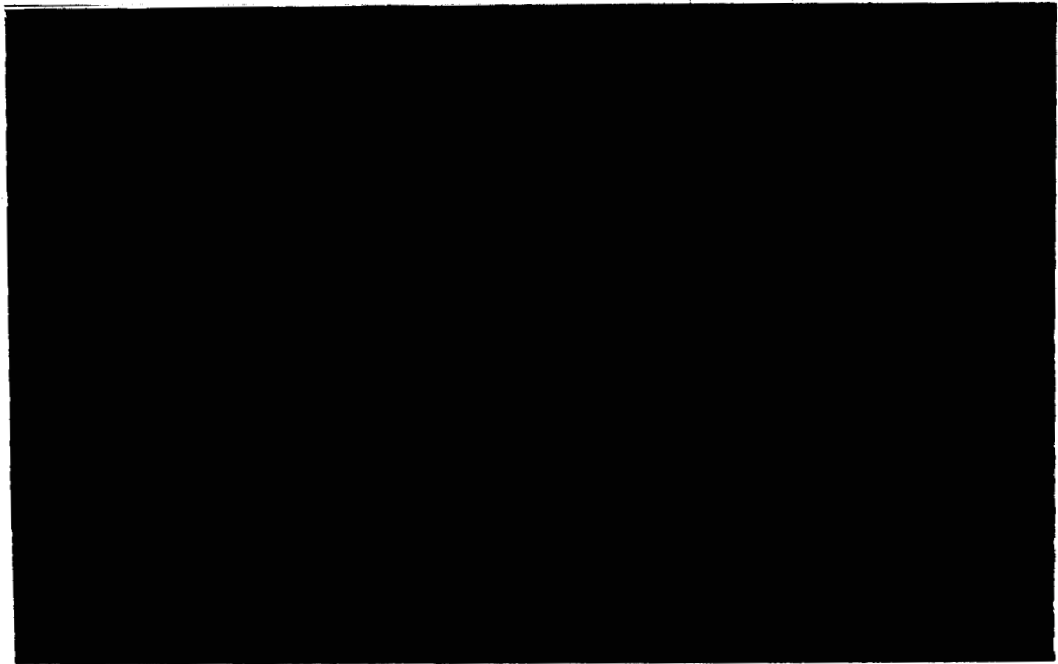


FIG. 3. OVOCITO MADURADO MOSTRANDO SU PRONUCLEO TEÑIDO  
CON ACETORCEINA.

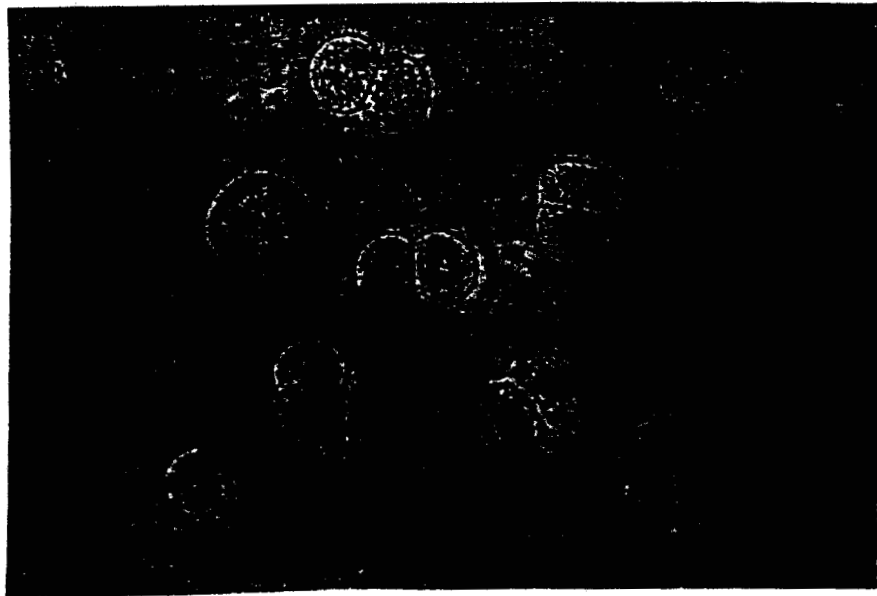


FIG. 4. EMBRIONES DE 2 CELULAS A 48 HORAS POSTINSEMINACION.



## DISCUSION.

El trabajar un modelo con una especie animal de abasto, como lo es el cerdo, resulta especialmente ventajoso ya que existen lugares específicos para su sacrificio y procesamiento, en donde se pueden obtener los ovarios que se emplearán en la técnica de FIV. De manera adicional la incidencia de hembras con respecto a otras hembras domésticas de abasto en dichos lugares es elevada (50 %), las cuales por ser poliéstricas contínuas de ovulación múltiple proporcionan una adecuada cantidad y calidad de folículos deseables (12-20/ hembra). La obtención de ovocitos a partir de esta vía es comun en la actualidad entre los diferentes investigadores de esta temática (Cheng et al, 1986; Eng et al, 1986; Yoshida, 1987; Mattioli et al, 1988a; Yoshida et al, 1989).

Para reducir la posibilidad de contaminación en los cultivos es deseable que los ovarios se obtengan in situ una vez abierta la canal dentro de la línea de matanza. Los ovarios se recibieron en buenas condiciones en el laboratorio, bastando como medio de transporte una solución salina misma que llegaba a 37° C. Mattioli et al (1988a) reportaron como medio de transporte una solución salina fosfatada Dulbecco suplementada con albúmina sérica bovina (BSA) 0.4%, Piruvato de sodio (PIR) 0.36 mM, glucosa 5.5 mM y kanamicina 70 µg/ ml a 20° C. Naito et al en 1988 reportaron el uso de una solución salina isotónica a 37° C. Nagai et al en 1988, con el mismo tipo de solución pero a 35° C lo mismo que Yoshida et al en 1989. Cabe hacer mención que no

hubo necesidad en el desarrollo de esta tesis del uso de antibióticos en la solución salina de transporte ya que con un adecuado lavado del material biológico en el laboratorio se reduce la incidencia de contaminación en cultivo. Por otra parte los diferentes autores consultados coinciden en procesar los ovarios dentro de un plazo de 2 hrs desde que fueron obtenidos, lo que en este trabajo dió buenos resultados.

En cuanto a la maduración de los ovocitos in vitro la suplementación del medio resulta ser determinante, teniendo los mejores resultados en este trabajo al usar 2 UI de hormona folículo estimulante (FSH), 2 UI de hormona luteinizante (LH), 1 µg de 17β-Estradiol, glucosa 5.5 mM, PIR 0.25 mM y gentamicina 50 µg/ml. Yoshida et al en 1989 reportaron buenos resultados al emplear el medio 199 con sales Earle y 10% de suero fetal de ternera (SFT) suplementado con 10 UI de gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG), 10 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG), 1 µg/ml de 17β-Estradiol, PIR 1 mM, glucosa 3 mM, lactato de calcio 9 mg/ml y sulfato de dibekacina 100 mg/ml. En ese trabajo, Yoshida et al analizaron el efecto de la suplementación de hormonas en forma aislada o combinadas en un período de 24 a 48 hrs sobre la maduración de los ovocitos y el grado de expansión de las células cúmulos (CC). No encontraron diferencia significativa entre el total de ovocitos que llegaron a metafase II (MII) a 36, 42 ó 48 hrs. La obtención de MII que lograron fué adecuada con la adición de PMSG o hCG con o sin 17β-Estradiol. En cuanto a la expansión de las CC tuvieron el mejor resultado

cuando incluyeron PMSG con o sin hCG o  $17\beta$ -Estradiol a 36 hrs de cultivo. La MII también se presentó en ovocitos en una alta proporción (45%) sin adición de hormona alguna, aunque hacen mención que esta maduración nuclear no garantiza la maduración citoplasmática para un buen desarrollo del proceso de la fertilización. Los mismos autores reportaron un efecto negativo del SFT para la expansión de las CC, mediado por la retención del ácido hialurónico dentro de la masa de las CC retardando la expansión. Cabe mencionar que estos investigadores resaltan la importancia de la relación morfológica y funcional entre la expansión de las CC y la maduración del ovocito in vivo tal y como se ha descrito que ocurre para diferentes especies de mamíferos entre ellas el cerdo. Sin embargo a pesar que ovocitos que cultivaron sin la estimulación hormonal llegaron al estadio de MII no encontraron en ellos expansión alguna de las CC. Como conclusión de su investigación señalan que la máxima expansión obtenida, ocurrió bajo la estimulación con PMSG a 36 hrs de cultivo (81%), cuando se adicionó hCG se tuvo el 77% y con hCG y  $17\beta$ -Estradiol el 78%. En el presente trabajo de tesis se obtuvieron el 90% de ovocitos con expansión de CC lo que se consideró adecuado para el tratamiento hormonal establecido.

Por otra parte Mattioli et al (1988b), usaron también el medio 199 con 10% de SFT suplementado con 2.5-5  $\mu\text{g/ml}$  de LH ovina, 1.5-5  $\mu\text{g/ml}$  de FSH porcina y 20  $\text{ng/ml}$  de prolactina porcina. En su sistema de maduración utilizaron el cocultivo del ovocito rodeado por sus CC con células somáticas del folículo y destacan que es necesaria la participación de las células

foliculares para una correcta maduración del ovocito, mediada ésta a través de la modulación de la interacción entre el ovocito y sus CC reportando inclusive la participación de un "factor de dispersión de CC" elaborado por las células foliculares. En relación a esto se ha formulado la hipótesis de que los gránulos corticales migran al oolema tan pronto como las uniones en hendidura entre CC y ovocito desaparecen.

En otro estudio de maduración de ovocitos de cerdo, Mattioli et al (1988a), investigaron la influencia de la participación de las células foliculares a dos niveles de la fertilización: la penetración y la formación del pronúcleo masculino (PNm). Encontraron una elevada incidencia de polispermia sobre todo en los ovocitos que mantuvieron en cocultivo, con células de pared folicular lo que explicaron no por fallas en el proceso de la maduración sino por una elevada concentración de espermatozoides al inseminar ( $5 \times 10^5/\text{ml}$ ) sin embargo considerando que se adicionó la misma concentración de espermatozoides para ovocitos con CC y los cocultivados, falta por esclarecer la razón de que los segundos tuvieran la mayor incidencia de polispermia. Dada la mayor cantidad de espermatozoides presentada en el ooplasma de los ovocitos en cocultivo, parece que la influencia de las células foliculares es a nivel del oolema por incremento en la unión de espermatozoides y la habilidad para fusionarlos con él.

En ese mismo trabajo de Mattioli et al, la formación del PNm en los ovocitos con CC fué apenas del 2%, los núcleos de

espermatozoides descondensados del 6% y los no descondensados del 92%. Por su parte los ovocitos en cocultivo tuvieron 62%, 20% y 18% respectivamente concluyendo los autores que la participación de las células foliculares es determinante para crear un ambiente hormonal equilibrado lo que demostraron al cultivar ovocitos con CC en medio condicionado previamente por células foliculares lo que incrementó la formación del PNm del 2% hasta el 45% y la penetración del 54% al 84%.

La técnica desarrollada en el presente trabajo de tesis contempla la participación de las células foliculares, debido a que es, muy difícil eliminarlas totalmente del cultivo por lo que los fragmentos de pared folicular que permanecieron pudieron ejercer un efecto favorable en el proceso de la maduración, penetración y formación del PNm.

Naito et al en 1988, mencionaron que la inclusión del líquido folicular porcino (LFP) al medio de maduración es importante por contener factores determinantes para una correcta maduración citoplasmática. El nivel de inclusión del LFP fue desde 5% hasta 50% v/v suplementando con 0.12 UI de FSH y/o 10 UI de hCG. Por otra parte encontraron que la inclusión del SFT a niveles superiores del 5% no contribuye a la formación del PNm siendo preferible la utilización del LFP. A pesar de ello en la presente tesis se obtuvieron buenos resultados al incluir 10% de SFT en el medio de maduración y prescindir del uso del LFP.

En cuanto a la temperatura y tiempo para maduración de los ovocitos de cerdo, Nagai et al en 1989, reportaron como satisfactorio de 28 a 29 hrs a 37° C, Naito et al en 1989 dieron un período de 48 hrs a 37° C, Mattioli et al (1988b) utilizaron de 44 a 46 hrs a 39° C, Kikuchi et al en 1991 46 hrs a 39° C, finalmente Yoshida et al en 1990 de 24 a 48 hrs a 38.5° C. En el presente trabajo se incubaron 48 hrs a 37° C al final de las cuales los ovocitos mostraron expansión de las CC, citoplasma uniforme de color café claro y sin retracción, característicos de una adecuada maduración.

El tratamiento que debe darse al semen de cerdo para la FIV varía considerablemente entre los investigadores. Cheng et al en 1986 incubaron (capacitaron) a 37° C durante 4 hrs sin mencionar alguna otra especificación excepto que el medio tenía un pH de 7.8. Hamano et al en 1989, indicaron que la concentración de espermatozoides en capacitación es fundamental para adquirir la habilidad fertilizante, sugiriendo como adecuado  $40 \times 10^8$  espermatozoides/ml para lo cual les hicieron 3 lavados con TYH suplementado con BSA 4% y centrifugaron 500 g/10 min. Incubaron a 37° C por 4 hrs. Al adicionarles taurina e hipotaurina desde 0.1 mM hasta 10 mM no se incrementó la motilidad ni la capacidad fertilizante in vitro. Reportaron además que una baja concentración de espermatozoides en capacitación de  $2.5 \times 10^8$  /ml afectó sensiblemente su eficiencia en fertilización por lo que argumentaron que la adquisición del "factor capacitante" que induce la hipermotilidad y reacción acrosomal se adquiere preferencialmente en incubación con

elevadas concentraciones de espermatozoides. Cuando incubaron espermatozoides en baja concentración en medio condicionado por altas concentraciones de espermatozoides, éstos fueron capaces de adquirir la habilidad fertilizante puesto que el "factor capacitante" permanecía en el medio.

Nagai et al en 1984, lavaron 5 ml de semen completo 3 veces por centrifugación a 400 g, resuspendieron en TYH con BSA 1% e incubaron 4 hrs a 37° C a concentraciones desde 0.8 hasta  $16 \times 10^8$ /ml obteniendo una buena capacitación.

Yoshida en 1987 diluyó el semen en un volumen igual de solución salina isotónica adicionada de BSA 1% y centrifugó a 50 g/3 min, lavó el sobrenadante 2 veces por centrifugación a 550 g/5 min e incubó a  $2 \times 10^8$ /ml 4 hrs a 37° C con resultados favorables.

Mattioli et al en 1988, procesaron el semen completo en un diluyente con  $1 \times 10^7$ /ml e incubaron a 16° C por 24 hrs al cabo de las cuales lavaron dos veces con solución salina isotónica suplementada con BSA 0.1% pH 7.2 y centrifugaron a 1000 g/3 min.

En el presente trabajo se colocó el semen completo en la caja de cultivo con medio de capacitación suplementado con PIR 1 mM, BSA 6% y gentamicina 50 µg/ml a una concentración de  $16 \times 10^6$  espermatozoides/ml y se incubó 4 hrs a 37° C al cabo de las cuales se manifestó la hipermotilidad con movimientos rectilíneos, vigorosos y progresivos lo que se consideró como la

adquisición de la "habilidad fertilizante" a pesar de la reducida concentración espermática en comparación a los autores anteriormente mencionados. Para inseminar se utilizaron los espermatozoides que nadaban cerca de la superficie del medio como en la técnica de "swim up" (Lopata, 1976).

Se inseminó con  $5 \times 10^4$  espermatozoides/microgota de 50  $\mu$ l lo que representó una concentración de  $1 \times 10^6$ /ml y una relación de  $5 \times 10^3$ /ovocito lo que resultó similar a lo reportado por Naito et al en 1989 que inseminaron con  $5 \times 10^5$ /ml en microgotas de 100  $\mu$ l con 10 ovocitos correspondiendo  $5 \times 10^4$ /100  $\mu$ l y una relación de  $5 \times 10^3$ /ovocito.

Yoshida en 1987 utilizó microgotas de 200  $\mu$ l a las que inseminó con  $4 \times 10^5$  espermatozoides, teniendo una relación de 2.5 a  $4 \times 10^4$ /ovocito. Mattioli et al (1988a) usaron pozos de 2 ml con 10-15 ovocitos los que inseminaron con  $5 \times 10^5$ /ml en una relación de  $6.6 \times 10^4$  a  $1 \times 10^5$ /ovocito.

A pesar de que las condiciones de cultivo fueron diferentes entre los autores consultados, es notoria la mayor proporción de espermatozoides por ovocito a la que se utilizó en el presente trabajo con excepción de Naito et al en 1989 con quien se coincidió.

Los resultados obtenidos en la presente tesis se consideran satisfactorios ya que se pudieron obtener embriones de 2, 4 y hasta de 8 células con una eficiencia promedio en la



obtención de embriones de 39 % (desde 10.3% hasta 80%) en 48 a 72 hs postinseminación, destacando la ausencia de polispermia.

Cheng et al en 1986 reiteraron la importancia de que los ovocitos sean fertilizados en forma monoespermática pues así tienen mayores probabilidades de continuar su desarrollo lo que demostraron cultivandolos en medio BMOC-2 y alcanzando el estadio de 2-4 células en 40 hrs y que al ser transferidos generaron preñez en el 40% de los casos, con un promedio de 3.5 lechones al nacimiento por hembra. Tuvieron además una eficiencia en fertilización de 56.3%. Mattioli et al (1988a) reportaron una eficiencia de 56-83% aunque obtuvieron una elevada incidencia de polispermia (45-78%) con un promedio de 1.47 a 3.86 espermatozoides penetrados/ovocito.

Hamano et al en 1989 obtuvieron el 70-80% de fertilización con 45-60% de polispermia. Yoshida en 1987 trabajó con ovocitos madurados in vivo y obtuvo el 80-100% de fertilización con el 25-100% de polispermia, encontrando diferencias significativas entre sementales por ejemplo el semental "A" cuyos espermatozoides tuvieron un tiempo de penetración máxima al ovocito de 6 hrs en contra del "B" que lo hizo en 2 hrs y explicando que esta variación obedece a la cantidad de espermatozoides capacitados disponibles al momento de la inseminación.

Mattioli et al (1988b) obtuvo penetración en el

83% de ovocitos madurados, de los cuales el 78% resultó polispermico con 3.86 espermatozoides/ovocito en promedio. Naito et al en 1988 obtuvieron el 85% de penetración sin embargo la formación real del PNm se observó en tan sólo el 38%. Yoshida et al en 1990 reportaron el 85% de fertilización y el 62.6% de polispermia.

Dado que nuestro reporte de cero porciento de polispermia contrasta con lo encontrado por otros autores se ~~piensa que es un aporte relevante de la técnica presentada, lo que puede deberse a una eficiente maduración nuclear, citoplasmática y membranar del ovocito así como un correcto manejo del semen, con lo que la interacción entre gametos se establece en forma adecuada para que se dé la reacción de zona e inhibición de la polispermia.~~

Con todo lo anterior se puede afirmar que la la técnica de fertilización in vitro con ovocitos de cerdo madurados in vitro desarrollada en el presente trabajo de tesis es satisfactoria sirviendo como una herramienta para continuar con la investigación en esta temática como por ejemplo en la contribución al conocimiento de los mecanismos involucrados en el proceso de la fertilización, en el apoyo a la reproducción asistida de cerdos de elevado valor genético y en la transferencia de esta tecnología hacia otras especies que la requieran.

APENDICE.

MEDIOS DE CULTIVO.

## MEDIO DE MADURACION.

COMPONENTE	CANTIDAD	ml/50 ml.
a) Medio 199	90 %	45
b) FCS	10 %	5

### Recomendaciones:

- 1.- Ajustar la osmolaridad a 280 - 290 mOsm con NaCl.
- 2.- Ajustar el pH a 7.4 con NaOH.
- 3.- Filtrar en botella estéril.
- 4.- Suplementar el día de uso con:

Glucosa	1 mg/ml.
Piruvato de Na	0.25 mM (10 µl de la solución concentrada/ml).
LH	2.0 UI /ml.
FSH	2.0 UI /ml.
Gentamicina	50 µg/ml (1 µl de la solución concentrada/ml).

### Filtrar y adicionar:

Estradiol	1 µg/ml (1 µl de la solución concentrada/ml).
-----------	---

## MEDIOS

### MEDIO TALP - HEPES.

Usado en lavado, dilución y capacitación de espermatozoides.

COMPONENTE (PM)	mg/50 ml	mM FINAL.
a) KCl ( 74.55)	11.5	3.1
b) NaCl ( 58.44)	292	100
c) NaH PO H O (137.99)	2	0.29
d) Hepes (238.30)	119	10
e) NaHCO ( 84.01)	105	25
f) Lactato de Na.(87%)	0.126 ml	21.6
g) Rojo Fenol	0.5	
h) CaCl 2H O (147.02)	15.5	2.10
i) MgCl 6H O (203.30)	15	1.5

#### Recomendaciones:

- 1.- Adicionar h) e i) al final.
- 2.- Aforar a 50 ml y medir osmolaridad.
- 3.- Ajustar osmolaridad a 290 - 300 mOsm con NaCl según fórmula siguiente:

Déficit de osmolaridad (DO) = Osm. deseada - Osm. medida.

DO - 290 x 9.176 x (vol. inicial del medio - vol. muestra tomada para osmolaridad) = mg de NaCl a ser adicionados.

- 4.- Ajustar pH a 7.4 con NaOH.
- 5.- Filtrar en botella estéril.
- 6.- Suplementar el día de usarlos con :
  - Piruvato de Na 1 mM (40 µl de la sol. concentrada/ml).
  - BSA (fracc. V) 6 mg /ml
  - Gentamicina 50 µg /ml (1 µl de la sol. concentrada/ml).
- 7.- Filtrar.

## MEDIO TALP.

Usado para fertilización.

COMPONENTE ( PM )	mg/50 ml	mM FINAL
a) NaCl ( 58.44)	333	114
b) KCl ( 74.55)	12.8	3.2
c) NaHCO ( 84.01)	105.2	25
d) NaH PO 2H O (137.99)	2.8	0.4
e) Lactato de Na. (87 %)	0.064 ml	10
f) Rojo Fenol	0.5	
g) CaCl 2H O (147.02)	15	2.0
h) MgCl 6H O (203.30)	5	0.5

### Recomendaciones:

1.- Adicionar g) y h) al final.

2.- Aforar a 50 ml y medir osmolaridad.

3.- Ajustar osmolaridad a 280 - 300 mOsm con NaCl.

4.- Ajustar pH a 7.4 con NaOH.

5.- Filtrar en botella estéril.

6.- Suplementar el día de uso con :

Piruvato de Na 0.25 mM (10 µl de la sol. concentrada/ml)

BSA (libre de ac. grasos) 6 mg /ml

Gentamicina 50 µg / ml (1 µl de la sol. concentrada/ml)

7.- Filtrar.

## SOLUCIONES CONCENTRADAS.

17B-Estradiol. 1 mg/ml en etanol. Almacenar en congelación

Piruvato de Na (25mM) 27.5 mg/10 ml de solución salina normal. Si se congela la solución concentrada no guardar por más de una semana. Almacenar en refrigeración.

Gentamicina 50 mg/ ml en solución salina. Guardar en refrigeración.

Alcohol ácido. Acido acético-metanol (1:3) Preparar justo antes de usarlo.

Orceína acética al 1% peso/volumen. El solvente es 60/40 agua/ácido acético, filtrar antes de usar.

## REFERENCIAS.

Austin,C.R. (1990): "Dilemmas in human IVF practice" En:"Fertilization in mammals" Bavister,B; Cummins,J; Roldán E.(ed) Plenum Press. New York, EUA. Cap.7 pp. 373-374.

Bavister,B; Yanagimachi,R. (1977): "The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro" Biol. Reprod. 16:228-237.

Bavister,B; Leibfried,M; Lieberman,G. (1983): "Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium" Biol. Reprod. 28:235-247.

Bavister,B. (1984): "A consistently successful procedure for in vitro fertilization of golden hamsters eggs" Gam. Res. 23:139-158.

Bavister,B. (1990) : "Aplications of IVF technology" En: "Fertilization in mammals" Bavister,B; Cummins,J; Roldán,E.(ed) Plenum Press. New York, EUA. Cap 25 pp 331-334.

Brackett,B; Seidel,G; Seidel,S. (1981): "New technologies in animal breeding" Academic Press. New York, EUA. pp 1-10

Chang,S; Ryan,R; Kuang,Y; Andersen,W. (1978): "Some observation on the development and function of ovarian follicles" En: "Control of reproduction of the cow" Sreñnan,J; Haghe,M; Nijhoff.(ed) Comission of the European Communities Directorate General of Agriculture. Luxemburgo. Bruselas. Cap. 1 pp 3-24.

Cheng,W; Moor,R; Polge,C. (1986): "In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro". Theriogenology 25(1):146.

Cran,D; Moor,R. (1990): "Programming the oocyte for fertilization" En: "Fertilization in mammals" Bavister,B;Cummins,J; Roldán,E.(ed) Plenum Press. New York. EUA Cap.4 pp 35-48.

Cummins,J. (1990): "Evolution of sperm form, levels of control and competition" En: Idem ibid. Cap. 5 pp 51-64.



Cummins, J. (1990): "Evolution of sperm form, levels of control and competition" En: *Idem ibid.* Cap. 5 pp 51-64.

Dekel, N; Galiani, D; Aberdan, E. (1990): "Regulation of rat oocyte maturation involvement of protein-kinasas" En: *Idem ibid.* Cap 2 pp 17-24.

Ding, J; Foxcroft, G. (1992): "Follicular heterogeneity and oocyte maturation in vitro in pigs" *Biol. of Reprod.* 47:648-655.

Downs, S. (1990): "The maintenance of meiotic in mammalian oocytes" En: "Fertilization in mammals" Bavister, B; Cummins, J; Roldán, E. (ed) Plenum Press, New York, EUA. Cap 1 pp 5-16.

Edwards, R; Bavister, B; Steptoe, P. (1969): "Early stages of fertilization in vitro in human oocytes matured in vitro". *Nature* 22:1632.

Eng, L; Kornegay, E; Huntington, J; Wallman, T. (1986): "Effect of incubation temperature and bicarbonate on maturation of pig oocytes in vitro" *J. Reprod. Fert.* 76:657-662.

Epel, D. (1977): "El proceso de la fertilización" *Scientific American* 63:72-82.

Eppig, J; Freter, R; Ward-Bailey, P; Schultz, R. (1983): "Inhibition of oocyte maturation in the mouse, participation of AMPc, steroid hormones and a putative maturation inhibitory factor" *Dev. Biol.* 100:39-49.

Fierro, R; Bonilla, E; Betancourt, M. (1991): "El uso de anticuerpos en estudios del proceso de fertilización en mamíferos" *Ciencia* 42:277-282.

Fraser, C. (1990): "Sperm capacitation and its modulation". En: "Fertilization in mammals" Bavister, B; Cummins, J; Roldán, E. (ed) Plenum Press. New York, EUA. Cap 12 pp 141-154.

Goto, K. (1989): "In vitro fertilization and development of in vitro matured bovine follicular oocytes" *J. Anim. Sci.* 67:2181-2185.

Greenwald,G; Terranova,P.(ed) (1988): "The physiology of Reproduction" Raven Press. New York, EUA. pp 387-415.

Gwatkin,R. (1977): "Fertilization mechanisms in man and mammals" Plenum Press, New York, EUA.

Hamano,S; Naito,K; Fukuda,Y; Toyoda,Y. (1989): "In vitro capacitation of boar ejaculated spermatozoa : Effect of conditioned media prepared from preincubated sperm suspension" Gam. Res. 24:483-489.

Hatanaka,Y; Nagai,T; Tobita,T; Nakano,M. (1992) "Changes in the properties and composition of zona pellucida of pigs during fertilization in vitro" J. Reprod. Fert. 95:431-440.

Hay,M; Gran,D.; Dott,H. (1979) "Regeneration of atretic sheep ovarian follicles in vitro" J. Reprod. Fert. 55:195-207.

Hedrick,J. (1986): "~~The molecular and cellular biology of fertilization~~" Plenum Press, New York, EUA.

Herrman,; Holtz,W. (1981a): "~~Collection of two cells pig embryos and their culture in media containing different protein components~~" Anim. Reprod. Sci. 4:137-142.

Herrman,H; Holtz,W. (1981b): "~~Culture of pig embryos in situ or after slaughter~~" Anim. Reprod. Sci. 4:143-147.

Huang,T; Yanagimachi,R. (1982): "Some factors controlling attachment of guinea pig spermatozoa to zona pellucida" Proceeding of the Japan Academy 58(44):101-104.

Iritani,A; Niwa,K; Imai,H. (1978): "Sperm penetration in vitro of pig follicular oocytes matured in culture" J. Reprod. Fert. 54:379-383.

Ishijima,S. (1990): "Changes in the beating pattern of spermatozoa during maturation and capacitation" En:"Fertilization in mammals" -- Bavister,B; Cummins,J; Roldán,E. (ed) Plenum Press. New York, EUA. Cap 9 pp 101-110.

Kikuchi, A; Nagai, T; Motlik, J. (1991): "Effect of follicle cells on in vitro fertilization of pig follicular oocytes" *Theriogenology* 35(1):225.

Lindner, G; Wright, R. (1978): "Morphological and quantitative aspects of development of swine embryos in vitro" *J. Anim. Sci.* 46(3):711-718.

Lopata, A. (1976): "A method for collecting motile spermatozoa from human semen" *Fertility and Sterility* 27:677-684.

Mangia, F; Canipani, R. (1977): "Biochemistry of growth and maturation of mammalian oocytes" En: "Development in mammals" Vol 2. Elsevier, New York, EUA. pp 1-18.

Martin, R. (1990): "Analysis of human sperm chromosome complements" En: "Fertilization in mammals" Bavister, B; Cummins, J; Roldán, E (ed) Plenum Press. New York, EUA. Cap 26 pp 365-372.

Mattioli, M; Galeati, M; Bacci, L; Seren, E (1988a): "Follicular factors influence oocyte fertilizability by modulating the intercellular cooperation between cumulus cells and oocyte" *Gam. Res.* 21:223-232.

Mattioli, M; Galeati, G; Seren, E. (1988b): "Effects of somatic follicular cells during pig oocytes maturation on egg penetrability and male pronucleus formation" *Gam. Res.* 20:177-183.

Motlik, J; Fulka, J. (1986): "Factors affecting meiotic competence in pig oocytes" *Theriogenology* 25(1)87-97.

Nagai, T; Niwa, K; Iritani, A. (1984): "Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes" *J. Reprod. Fert.* 70:271-275.

Nagai, T; Kikuchi, K; Motlik, J. (1991) "IVF in pig follicular oocytes at metaphase-1" *Theriogenology* 35(1)248.

Naito, K; Fukuda, Y; Toyoda, Y. (1988): "Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro" *Gam. Res.* 21:289-295.

Naito,K; Fukuda,Y; Ishibashi,I. (1989): "Developmental ability of porcine ova matured in porcine follicular fluid in vitro and IVF" Theriogenology 31(5)1049-1057.

Naito,K; Toyoda,Y; Yanagimachi,R. (1992): "Production of normal mice from oocytes fertilized and developed without zonae pellucidae" Human Reproduction 7(2):281-285.

Olds,C. (1990): "Variation in the quality of sperm motility and its relationship to capacitation" En: "Fertilization in mammals" Bavister,B; Cummins,J; Roldán,E. (ed) Plenum Press. New York, EUA. Cap 8 pp 91-99.

Parrish,P. (1985): "Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro" Theriogenology 24(5):537-544.

Paterson,M; Koothan,T; Morris,K; O'byrne,K; Braude,P; Williams,A; Aitken,J. (1992): "Analysis of the contraceptive potential of antibodies against native and deglycosylated porcine ZP3 in vivo and in vitro" Biol. of Reprod. 46:523-534.

Phillips,D; Vanaja,R; Perott,M. (1990): "Structure of the cumulus oophorus on the time of fertilization" Cell Tissue Res. 261:249-259.

Roldan,E; Harrison,R. (1990): "Molecular mechanisms leading to exocytosis during the sperm acrosome reaction" En: "Fertilization in mammals" Bavister,B; Cummins,J; Roldán,E. (ed) Plenum Press, New York, EUA. Cap 15 pp 75-196.

Rosado,A; Rosales,A. (1991): "Maduración folicular en el mamífero, atresia y determinantes bioquímicos" Ciencia 42(1)81-97.

Rufo,G. (1981): "Purification and characterization of a calcium transport inhibitor protein from bovine seminal plasma" J. Biological Chemistry 257(8)4627-4632.

Saxena,N; Peterson,R; Sharif,S; Saxena,K; Rusell,L. (1986): "Changes in the organization of surface antigens during in vitro capacitation of boar spermatozoa as detected by monoclonal antibodies" J. Reprod. Fert. 78:601-614.

Stephens, P.; Edwards, R. (1978): "Birth after the Preimplantation of a human embryo" Lancet 2:366.

Suzuki, F. (1990): "Morphological aspects of sperm maturation modification of the sperm plasma membrane during epididymal transport" En: Bavister, B; Cummins, J; Roldán, E (ed) Plenum Press. New York, EUA. Cap. 6 pp 65-75.

Thibault, C. (1977): "Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes?" J. Reprod. Fert. 51:1-15.

Toyoda, Y; Naito, K. (1990): "IVF in domestic animals" En: Bavister, B; Cummins, J; Roldán, E (ed) Plenum Press. New York, EUA. Cap. 24 pp 335-347.

Tsafiri, A; Channing, R. (1975a): "An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis in vitro" Endocrinology 96:922-927.

Tsafiri, A; Cornelia, P, Channing, P. (1975b): "Influence of follicular maturation and culture condition on the meiosis of pig oocytes in vitro" J. Reprod. Fert. 43:199-152.

Vanderhyden, B; Armstrong, A. (1989): "Role of cumulus cells and serum on the in vitro maturation, fertilization and subsequent development of rat oocyte" Biol. of Reprod. 40:720-728.

~~Wassarman, P. (1987): "The biology and chemistry of Fertilization" Science 235:553-560.~~

~~Wassarman, P. (1989): "La fecundación en los mamíferos" Inv. y Ciencia 149:48-55.~~

Wildt, D. (1990): "Potential application of IVF technology for species conservation" En: "Fertilization in mammals" Bavister, B; Cummins, J; Roldán, E (ed) Plenum Press. New York, EUA. Cap 25 pp 349-364.

Wolf, D. (1990): "In vitro fertilization and embryo transfer: En: Idem ibid. Cap 12 pp 207-233.

Wright, R; Bandioli, K. (1981): "Aspects of in vitro fertilization and embryo culture in domestic animals" J. Anim. Sci. 53(3):702-710.

Yanagimachi,R.(1988): "Sperm-egg fusion" En: "Membrane fusion in fertilization cellular transport and viral infections" Duzgunes,N; Bronner,F (ed) Academic Press. San Diego, EUA. pp 3-43.

Yoshida,M. (1987): "In vitro fertilization of pig oocytes matured in vivo" Jpn, J. Vet. Sci. 49(4)711-718.

Yoshida,M; Bamba,K; Kojima,Y. (1989): "Effects of gonadotropins and Estradiol-17B on the timing of nuclear maturation and cumulus mass expansion in pig oocytes cultured in vitro" Jpn. J. Anim. Reprod. 35(2)86-91.

Yoshida,M; Ishizaky,Y; Kawagishi,H. (1990): "Blastocyst formation by pig embryos resulting from IVF of oocytes matured in vitro" J. Reprod. Fert. 88:1-8.

Younis,A; Brackett,B; Fagres,M. (1989): "Influence of serum and hormones on bovine oocytes maturation and IVF" Gam. Res.23:189-201.