

225403

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**



COORDINACIÓN DE BIBLIOTECAS Y  
DOCUMENTACIÓN



**Casa abierta al tiempo**

**INFLUENCIA DEL LIQUIDO FOLICULAR DE CERDO SOBRE LA  
MADURACIÓN CITOPLÁSMICA DEL OVOCITO.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL  
P R E S E N T A  
BIOL. LOURDES GALLARDO ORNELAS**

**DIRECTOR:  
DR. MIGUEL BETANCOURT RULE**

**ASESOR:  
DR. HUMBERTO GONZÁLEZ MÁRQUEZ**

MEXICO, D.F.

SEPTIEMBRE DE 1998

La Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa se encuentra dentro del Padrón de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada, número 96380.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, dentro del proyecto apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de convenio CONACYT-1407PN y parcialmente financiado por el Programa de Apoyo Académico para el Posgrado de Excelencia.

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Francisco y Carmen, y a mis hermanos, Francisco Javier y Carmen, quienes siempre me han brindado su amor, cariño y apoyo durante toda mi vida y con quienes ahora comparto el fruto del trabajo realizado.

Al Dr. Miguel Betancourt, por su confianza, paciencia y dirección durante la realización de éste trabajo.

Al Dr. Humberto González Márquez, por sus sabios consejos y por haber compartido su tiempo y conocimientos para la realización de éste trabajo.

Al Dr. Salvador Romo García, por la revisión y valiosos comentarios realizados al trabajo.

Al M. en C. Eduardo Casas Hernández, por su compañerismo, y valiosos consejos en la parte de cultivo de células.

Al MVZ Jesús Rosas Córdova, por su gran amistad y ayuda incondicional durante la realización de éste trabajo.

A la gran lista de compañeros del laboratorio y amigos de la división que mostraron su disposición y ayuda para la realización del trabajo.

Agradecemos al Rastro Frigorífico ABC, S.A. de C.V., por las facilidades otorgadas para la obtención de ovarios de cerdo y a la Granja Tomacoco, S.A. de C.V. por la donación de la muestra de semen porcino.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	VII
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
1. Maduración del Ovocito	2
1.1 Maduración Nuclear	3
1.2 Maduración Citoplásmica	7
1.2.a Maduración Citoplásmica y <i>Activación</i>	10
1.2.b Maduración Citoplásmica y <i>Fertilización</i>	11
1.2.c Maduración Citoplásmica y <i>Desarrollo Embrionario</i>	12
2. Desarrollo del Pronúcleo Masculino	13
<b>II. ANTECEDENTES</b>	16
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	19
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	20
<b>V. OBJETIVOS</b>	21
<b>VI. MATERIAL Y METODOS</b>	22
1. Obtención y Fraccionamiento del Líquido Folicular de Cerdo	22
1.1 Obtención de la Fracción de 0-100 kDa	22
1.2 Cromatografía de Intercambio Iónico de la Fracción de 0-100 kDa	23
2. Maduración y Fertilización <i>in vitro</i>	25
2.1 Obtención de los Complejos Ovocitos-Cúmulus (COC's)	25
2.2 Maduración de los COC's	26
2.3 Fertilización de los Ovocitos	26
2.4 Evaluación de la Maduración y Fertilización	30
3. Análisis de Proteínas de las subfracciones del Líquido Folicular de Cerdo	33
3.1 Electroforesis en PAGE-SDS	33
3.2 Análisis de los Geles por Densitometría	34
4. Digestión de las Proteínas de la Subfracción P4	35
5. Análisis Estadístico	35
<b>VII. RESULTADOS</b>	37
1. Obtención y Fraccionamiento del Líquido Folicular de Cerdo	37
2. Maduración Nuclear	37
3. Fertilización	39
4. Análisis de Proteínas de las subfracciones del Líquido Folicular de Cerdo	41
5. Efecto de la Digestión de Proteínas de la subfracción P4	43

<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	45
1. Expansión de Células Cúmulus	45
2. Maduración Nuclear	46
3. Fertilización	49
4. Maduración Citoplásmica. <i>Formación del Pronúcleo Masculino</i>	50
5. Líquido Folicular y Maduración del Ovocito	53
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	56
<b>X. PERSPECTIVAS</b>	57
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA</b>	58

## RESUMEN

La maduración del ovocito es un fenómeno complejo que involucra cambios en su núcleo y en su citoplasma. Su regulación es multifactorial y estrictamente dependiente del ambiente folicular en el cual se lleva a cabo. En el cerdo se ha reportado que el grado de maduración citoplásmica del ovocito disminuye en ovocitos madurados *in vitro* que con aquellos madurados *in vivo*. Se ha demostrado que la adición del líquido folicular de cerdo al medio de maduración mejora la maduración citoplásmica del ovocito evaluada por un incremento en la formación del pronúcleo masculino en el ovocito fertilizado. Recientemente se han logrado fraccionar parcialmente el líquido folicular de cerdo, encontrando algunas fracciones que regulan tanto la maduración nuclear como citoplásmica del ovocito de la misma especie. En éste estudio se logró obtener una fracción del líquido folicular de cerdo que promueve la formación del PN masculino, así como también se demostró que el(los) factor(es) de dicha fracción que promueve(n) la formación del pronúcleo masculino es(son) de naturaleza protéica.

El líquido folicular se obtuvo de ovarios de cerdo mediante la punción de folículos de 2-5 mm de diámetro. Se separó la fracción de 0-100 kDa del líquido folicular mediante ultrafiltración y, posteriormente, se obtuvieron cuatro subfracciones mediante cromatografía de intercambio iónico (P1, P2, P3 y P4). Las subfracciones se dializaron, liofilizaron y resuspendieron en medio KRB. Para probar el efecto de las subfracciones durante la maduración *in vitro* de los ovocitos se formaron 6 grupos de estudio : KRB (control negativo), LFC (control positivo), P1, P2, P3 y P4 (subfracciones). Los complejos ovocitos-cúmulus se incubaron en presencia de cada uno de los medios de maduración durante 48 h a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de aire. Posteriormente, los ovocitos se fertilizaron con  $5 \times 10^5$  espermatozoides/ml y se incubaron durante 18 h. Finalmente, los ovocitos se fijaron y se evaluó la maduración nuclear y la fertilización.

Los resultados muestran que el porcentaje de maduración nuclear (ruptura de la vesícula germinal) obtenido en éste estudio varió del 89 al 99 %. En todos los grupos exceptuando el grupo de LFC se observó un 10-20 % de ovocitos en metafase I y un 80-90 % de ovocitos en metafase II. El grupo LFC sólo alcanzó un 60 % de ovocitos en metafase

II. El porcentaje de fertilización del 15 al 39 %. Los grupos P2 y P4 mostraron un incremento de la fertilización, mientras que el grupo P1 mostró una disminución cuando se comparó los grupos con el grupo LFC. El grado de formación del pronúcleos masculinos varió de 59 a 100 %. La subfracción P4 mostró un efecto similar al grupo LFC y positivo cuando se comparó con el grupo KRB, mientras que la subfracción P3 mostró un efecto inhibitorio cuando se comparó con el grupo KRB. El análisis de las proteínas de la subfracción P4 mostró un total de ocho bandas de proteínas cuyas  $M_r$  oscilaron entre 28 y 80 kDa. Cuando se realizó la digestión de las proteínas de la subfracción P4 disminuyó la formación de pronúcleo masculino al compararse con la subfracción intacta (64% vs 100%).

Se han descrito numerosos factores de tipo proteico que regulan la maduración del ovocito, entre ellos las gonadotrofinas y el factor de crecimiento epidérmico han sido propuestos como promotores de la maduración citoplásmica del ovocito. Es posible que algunos de los componentes de la subfracción P4 correspondan a éstos factores o sean moléculas que actúan de manera similar a éstos para promover la maduración citoplásmica del ovocito.

## I. INTRODUCCION

El desarrollo de técnicas de fertilización *in vitro* (FIV) en animales domésticos representa un gran potencial, tanto para la investigación básica en embriología como en la aplicación práctica para la reproducción animal. En lo referente a la investigación básica, el estudio de los factores celulares y moleculares que operan durante la maduración del ovocito y la fertilización son la base para definir las condiciones adecuadas para la producción de embriones *in vitro*.

La fertilización es un proceso complejo que implica la participación de dos gametos: el óvulo y el espermatozoide. Este proceso puede dividirse en tres fases principales : el reconocimiento del óvulo por el espermatozoide, la regulación de la entrada del espermatozoide al óvulo y la activación del metabolismo del óvulo para que inicie el desarrollo embrionario.

El logro de una fertilización completa con potencial para desarrollar un embrión saludable requiere tanto de la contribución de un ovocito como la de un espermatozoide que hayan logrado una maduración adecuada. La maduración del espermatozoide implica diversos eventos como la maduración epididimaria, la capacitación y la reacción acrosomal mientras que la maduración del ovocito implica dos tipos principales que se han descrito como la maduración nuclear y la maduración citoplasmática.

Los ovocitos de los mamíferos euterios provenientes de folículos antrales grandes cuyo diámetro citoplásmico está entre 60-150  $\mu\text{m}$ , están compuestos de dos compartimientos, el núcleo llamado vesícula germinal (VG) y el citoplasma. La membrana plasmática es de la misma estructura, dimensiones y composición que las membranas plasmáticas en general y presenta microvellosidades organizadas en espacios regulares sobre la superficie del ovocito (Thibault y cols, 1987; Buccione y cols, 1990 )

El ovocito está rodeado de una capa acelular de glicoproteínas llamada zona pelúcida (ZP), sintetizada por el mismo al inicio de su crecimiento y en el lado externo a ésta capa está rodeado por una masa de células cuboidales llamada *cumulus ooforus*. A esta estructura del ovocito se le ha denominado complejo ovocito-cúmulus (COC's). Aquellas células que están en contacto directo con la ZP se les llama la *corona radiata*, estas están conectadas al ovocito a través de una o varias prolongaciones citoplásmicas que atraviesan la ZP. La parte terminal de la prolongación se caracteriza por tener forma de botón, el cual puede estar unido al plasmalema del ovocito superficialmente (ratón, hámster, rata) o estar formando una indentación profunda (oveja, vaca, conejo). Las uniones que se forman entre las células de la *corona radiata* y el ovocito, son de tipo intermedio (*zonula adherens*) con una o varias uniones pequeñas de tipo *gap*. Mientras tanto las uniones que se forman entre las células del *cumulus ooforus* sólo son de tipo *gap*, sin presentarse las uniones de tipo intermedio como con el ovocito (Thibault y cols, 1987 ; Buccione y cols, 1990)

## 1. MADURACIÓN DEL OVOCITO.

La maduración del ovocito es un fenómeno complejo que involucra cambios tanto en su núcleo como en su citoplasma. Su regulación es multifactorial y estrictamente dependiente del ambiente folicular en el cual se lleva a cabo (Wu y cols, 1996). En los mamíferos comienza durante la ovogénesis, la cual se inicia en una etapa temprana del desarrollo fetal y termina de meses a años después en la hembra sexualmente madura. Durante el proceso de ovogénesis el ovocito sufre una serie de cambios bioquímicos y morfológicos que lo preparan para ser fertilizado y llevar a cabo un buen desarrollo embrionario.

Los cambios más aparentes e importantes son la formación de un núcleo haploide y un aumento de tamaño del ovocito debido al material acumulado en su citoplasma. Esto incluye moléculas como fuentes de energía, organelos, enzimas, precursores de la síntesis de DNA, RNA y proteínas, RNAs mensajeros de vida media larga, proteínas estructurales y

factores reguladores morfogenéticos que controlan la embriogénesis temprana. De ésta manera se ha considerado a la síntesis de RNA y de proteínas en el ovocito como uno de los indicadores de su crecimiento y madurez.

### **1.1. Maduración Nuclear.**

La maduración nuclear implica una progresión de la cromatina nuclear del estado de diploteno de la primera profase meiótica hasta la metafase II de la segunda división meiótica.

Los ovocitos en estado de diploteno adquieren la capacidad de llevar a cabo la reducción cromosómica ó competencia meiótica durante el crecimiento del mismo y cuando ha alcanzado por lo menos el 80 % del tamaño total (Thibault y cols, 1987 ; Eppig, 1996). La adquisición de la competencia meiótica ocurre en dos pasos, primero los ovocitos en crecimiento adquieren la capacidad de llevar a cabo la ruptura de la vesícula germinal (RVG) y progresar hacia la metafase I (MI) y, segundo, adquieren la capacidad de progresar de la MI a la metafase II (MII). Así, los ovocitos que contienen VG son considerados como inmaduros en el contexto de la meiosis, mientras que los ovocitos que han progresado hacia la MI y anafase I se consideran como ovocitos en proceso de maduración; mientras que los ovocitos que han completado la primera división meiótica y han progresado de la telofase I a la prometafase II son considerados como maduros meioticamente y están preparados para la ovulación y la penetración por espermatozoides (McGaughey, 1978 ; Thibault y cols, 1987 ; Eppig, 1993).

La adquisición de la competencia meiótica del ovocito también está correlacionada con el tamaño del folículo. Estudios *in vitro* demuestran que los ovocitos provenientes de folículos preantrales aun no son competentes para llevar a cabo la maduración nuclear. Los provenientes de folículos antrales adquieren inicialmente la competencia para llevar a cabo la RVG pero aun no son capaces de completar la maduración y permanecen en arresto en la MI, sin embargo aquellos ovocitos provenientes de folículos antrales con un mayor

crecimiento resultan competentes para progresar de la MI a la MII (Motlík y cols, 1984 ; Motlík y Fulka, 1986 ; Eppig, 1993).

Se ha determinado que la adquisición de la competencia para llevar a cabo la RVG es independiente de la presencia de las células foliculares y contactos celulares heterólogos, pues se ha observado que los ovocitos de mamíferos competentes cultivados *in vitro* fuera de sus folículos con o sin células cúmulus inmediatamente reinician la meiosis (Thibault y cols, 1987 ; Eppig, 1993).

Algunos factores que se encuentran en el folículo mantienen al ovocito bajo arresto meiótico, por lo que se ha sugerido que éste proceso está mediado por el paso de sustancias a través de las células foliculares hacia el ovocito (Buccione y cols, 1990 ; Eppig, 1996 ). Entre algunas de las moléculas que se ha sugerido están implicadas en el arresto meiótico están : AMP<sub>C</sub>, hipoxantina, adenosina y el péptido Inhibidor de la maduración del ovocito (OMI), entre otras (Thibault y cols, 1987 ; Rosales y Rosado, 1989 ; Buccione y cols, 1990 ; Eppig, 1993).

Al parecer, el origen del AMP<sub>C</sub> son las células cúmulus y el propio ovocito . Tanto en ovocitos de ratón como de rata se ha observado que existe una cercana relación entre la disminución de los niveles de AMP<sub>C</sub> en el folículo y el reinicio de la meiosis (Thibault y cols, 1987), por lo que se ha sugerido que, el incremento de los niveles de AMP<sub>C</sub> en las células de la granulosa activa la síntesis de un supuesto inhibidor que es transmitido al ovocito a través de uniones comunicantes para suprimir la RVG (Rosales y Rosado, 1989).

La hipoxantina se ha detectado en el líquido folicular en concentraciones suficientes para prevenir la RVG en el ovocito de ratón. Se cree que la hipoxantina es generada por las células de la granulosa y es transferida al ovocito a través de las uniones de tipo *gap* (Rosales y Rosado, 1989) Por otro lado la adenosina también presenta actividad inhibitoria sobre la RVG. Se ha demostrado que este nucleósido incrementa la acción de la hipoxantina en el arresto de la RVG. Se ha propuesto que tanto la hipoxantina como la adenosina pueden mantener el arresto meiótico debido a que la adenosina estimula a la

adenilato ciclasa a través de su receptor en la membrana plásmica del ovocito manteniendo los niveles altos de AMP<sub>c</sub>, mientras que la hipoxantina es transferida al ovocito por las células cúmulus previniendo la hidrólisis del AMP<sub>c</sub> manteniendo los niveles de arresto del AMP<sub>c</sub> (Eppig, 1993).

Otro factor inhibidor de la maduración nuclear es el OMI, péptido pequeño de 2000 dalton que es secretado por las células de la granulosa al líquido folicular. Está demostrado que este factor sólo actúa en los COC's, pero no en ovocitos libres de sus células cúmulus, manteniendo la inhibición de la maduración nuclear (Rosales y Rosado, 1989). Se ha propuesto que por lo menos existen dos o tres polipéptidos OMI en el líquido folicular de cerdo, los cuales no son especie específicos. Sin embargo algunos estudios no han podido demostrar que el líquido folicular de cerdo y de bovino ó las fracciones purificadas de éstos tengan éste efecto inhibitorio de la reanudación de la meiosis en los ovocitos de vaca, cerdo o rata (Thibault y cols, 1987).

Así como existen varias señales negativas que mantienen al ovocito en arresto meiótico, también existen señales positivas que las contrarrestan. Una de éstas señales positivas es generada por el efecto de la gonadotrofinas (Yoshida y cols, 1989 ; Mattioli y cols, 1991). La liberación preovulatoria de la hormona luteinizante (LH) induce la maduración meiótica, favoreciendo la RVG probablemente a través de un efecto indirecto regulado por las células foliculares (células de la granulosa) (Buccione y cols, 1990 ; Eppig 1993). A este respecto Eppig (1993) ha manejado dos hipótesis: 1) Se cree que las gonadotrofinas interrumpen la comunicación intercelular privando al ovocito de los factores que inducen el arresto meiótico, como se ha descrito en el caso del ratón ó 2) Que las gonadotrofinas generan una señal inductora de la maduración por las células de la granulosa que contrarrestan el efecto inhibitorio del ambiente folicular como en el caso de la oveja, cerdo y hámster.

Dentro de la segunda hipótesis, se ha propuesto que una de las señales positivas que se generan en las células de la granulosa involucran a los iones de calcio. Es posible que la

LH induzca un incremento en el inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) libre, el calcio, o ambos, en las células de la granulosa y a su vez el IP<sub>3</sub>/Calcio será transferido al ovocito por las uniones *gap*. Al parecer el IP<sub>3</sub> moviliza las reservas de calcio las cuales actúan por una vía dependiente de calmodulina, activando a la fosfodiesterasa AMP<sub>c</sub> la cual disminuirá los niveles de AMP<sub>c</sub> y propiciará la RVG (Homa y cols, 1993 ; Eppig, 1993).

En el caso del ovocito humano, se cree que la señal positiva generada por gonadotrofinas (hormona folículo estimulante-FSH) activa la síntesis de proteínas involucradas en la maduración y la de algunos factores de crecimiento como el de crecimiento epidérmico (EGF) y el de crecimiento parecido a insulina tipo I (IGF-I). Es posible que ambos factores de crecimiento induzcan el desacoplamiento metabólico entre las células cúmulus y el ovocito permitiendo de ésta forma que se reinicie la maduración nuclear (Gomez y cols, 1993).

La maduración nuclear en el ovocito de mamíferos requiere de la producción de un factor activo llamado factor promotor de la maduración (FPM), que consiste de dos componentes, una proteína de 34 kDa, la p34<sup>cdc2</sup> y la ciclina B. La p34<sup>cdc2</sup> es una cinasa serina/treonina que requiere ser desfosforilada para su activación, en cambio la ciclina B requiere ser fosforilada para su actividad (Eppig, 1993 ; Eppig, 1996).

La actividad del FPM es detectable al momento de la RVG y alcanza un pico en ovocitos al momento de la MI (Casas y cols, 1998). Posteriormente ésta actividad disminuye al momento de la liberación del cuerpo polar, pero alcanza un nivel alto otra vez en ovocitos en MII (Eppig, 1993 ; Eppig, 1996). Los cambios en la actividad del FPM durante la maduración del ovocito del cerdo se han medido a través de la actividad de la Histona H1 cinasa (Naito y cols, 1995).

El FPM tiene varias funciones durante el proceso de la maduración nuclear, entre ellas están :

- inicio de la transición de la fase de G2 a la mitosis
- disolución de la envoltura nuclear

- condensación de cromosomas
- organización del huso acromático
- arresto de la metafase

Se ha indicado que durante la RVG, el desensamblaje de la envoltura nuclear ocurre debido a que la cinasa  $p34^{cdc2}$  regula la fosforilación de sitios específicos sobre las lamininas nucleares, que son los componentes mayores que mantienen la integridad de la envoltura nuclear. En cambio durante la condensación de los cromosomas, ocurre un evento clave que es la fosforilación de todas las proteínas cromosómicas incluyendo las histonas. Es probable que la  $p34^{cdc2}$  fosforile directamente a las histonas y otras proteínas que promueven la condensación de los cromosomas (Eppig, 1993).

En condiciones de cultivo se ha observado que durante la maduración nuclear de los ovocitos de cerdo, la actividad del FPM se incrementa gradualmente durante un período de incubación. Entre 8-12 h alcanza niveles suficientes para estimular la maduración. Así la RVG requiere de la síntesis de proteínas en una etapa específica de la maduración en condiciones *in vitro* (Motlik y Fulka, 1986).

## 1.2 Maduración Citoplásmica.

La maduración citoplasmática del ovocito de mamíferos se ha considerado como un evento importante que incluye varios cambios necesarios en el mismo para prepararlo para la activación, fertilización, y desarrollo embrionario a preimplantación (Eppig y cols, 1996 ; Damiani y cols, 1996).

Este tipo de maduración se inicia desde los estados tempranos del desarrollo del ovocito, donde los RNAm y proteínas maternas son sintetizadas y almacenadas para el posterior desarrollo embrionario. Sin embargo algunos otros aspectos de la maduración citoplásmica ocurren también durante la última etapa de maduración del folículo y en sincronía con el reinicio de la maduración nuclear. Se ha reportado que estos eventos de la maduración citoplásmica son el resultado tanto de la síntesis de proteínas como del paso del

contenido de la VG al citoplasma del ovocito durante la maduración nuclear (Wu y cols, 1996 ; Eppig 1996).

En los mamíferos euterios se ha establecido un patrón bifásico del crecimiento del folículo y del ovocito. Durante la primera fase, el crecimiento del ovocito y folículo se correlacionan positivamente y antes de la formación del antro folicular aparece la segunda fase donde el crecimiento del folículo consiste en la actividad mitótica de las células de la granulosa y de la teca, así como la acumulación de líquido folicular como uno de los eventos dominantes.

A nivel folicular existen dos tipos de influencias que son requeridas durante la maduración del ovocito; la influencia hormonal, principalmente de esteroides sobre tejidos receptivos (cerebro, oviducto, utero) y la influencia de factores intrafoliculares que actúan sobre el ovocito (Sirard y cols, 1995).

Existe la posibilidad de que los factores intrafoliculares capaces de regular varias funciones del ovocito pueden ser liberados por las células somáticas del folículo. Esto indica que la maduración del ovocito es dependiente de un programa autónomo de desarrollo del ovocito y la presencia de señales liberadas por las células somáticas.

Dos poblaciones de células somáticas están involucradas en la maduración citoplásmica del ovocito: las células cúmulus y las células murales de la granulosa. El ovocito mantiene una íntima relación con éstas a través de uniones de tipo *gap*. Esta relación es necesaria para establecer una cooperación metabólica entre las células somáticas y el ovocito, ya que es a través de éstas uniones que se transportan varios compuestos al ovocito que son inicialmente capturados por las células foliculares. Sin embargo, también es posible que los ovocitos de mamíferos acumulen macromoléculas producidas dentro o fuera del folículo sin la ayuda de las células foliculares, ya que se ha reportado que moléculas tan grandes como de 150 kDa pueden atravesar la zona pelúcida (Eppig y cols, 1996).

Durante la maduración del ovocito el estímulo de las gonadotrofinas provoca cambios en los COC's y en el reinicio de la meiosis. Un estudio *in vivo* realizado en cerdo

establece que, entre estos cambios, existe una síntesis de ácido hialurónico a las 16 h después del estímulo con la gonadotropina coriónica humana (hCG) y a las 24 h las células cúmulus ya están expandidas, permaneciendo aún en contacto con el ovocito las células de la *corona radiata*. Las células de la *corona radiata* mantienen contacto efectivo con el ovocito y el ambiente folicular hasta las 24 h post-hCG, cuando los ovocitos aun se encuentran en la MI. A las 32 h post-hCG la capa de las células de la *corona radiata* está menos compacta, por lo que disminuye el acoplamiento intercelular entre el ovocito y las células cúmulus (Motlik y cols, 1986).

La persistencia del acoplamiento entre el ovocito y las células foliculares *in vivo* hasta la MI se ha cuestionado, en cuanto a su papel en la capacidad de desarrollo del ovocito después de la fertilización. En varias especies, sólo aquellos ovocitos aislados de folículos preovulatorios con células cúmulus expandidas y que han progresado hasta la MI son capaces de desarrollarse completamente (Motlik y cols, 1986). Así, el contacto del ovocito con su ambiente folicular hasta la MI resulta ser un requisito necesario para su desarrollo.

Durante la maduración *in vitro* (MIV), los ovocitos de mamífero también están rodeados de células foliculares unidas a través de uniones *gap* (Motlik y cols, 1986). Estas células foliculares se han implicado en el soporte metabólico del ovocito, transportando moléculas de peso molecular relativamente bajo, como iones y aminoácidos (Salustri y cols, 1993 ; Funahashi y Day, 1995 ; de Matos y cols, 1997). Se ha demostrado que la presencia de las células cúmulus unidas al ovocito no es necesaria para la maduración nuclear; sin embargo, sí juegan un papel importante en la capacidad de los ovocitos para desarrollarse a blastocisto (Freeman y cols, 1995). Por otro lado, otros estudios han demostrado que, cuando el ovocito se madura *in vitro*, su competencia para la fertilización, descondensación de la cromatina y formación del pronúcleo (PN) masculino es mejorada cuando se co-cultiva con células cúmulus y células murales de la granulosa (Salustri y cols, 1993).

Las células de la granulosa y las células cúmulus no tienen únicamente un papel nutricional, sino también juegan un papel regulador en el desarrollo del ovocito. Se ha

demostrado que las células de la granulosa inducen la síntesis de proteínas o polipéptidos en el ovocito, lo cual le permite al citoplasma ser competente para cooperar con el genoma masculino, mientras que la presencia de las células cúmulus se ha demostrado necesaria para promover la descondensación del núcleo del espermatozoide (Thibault y cols, 1987 ; Kikuchi y cols, 1993 ; de Matos y cols, 1997).

Algunos estudios han demostrado que éstas células afectan el patrón de síntesis y fosforilación de las proteínas en el ovocito de manera estadio específica (Salustri y cols, 1993 ; Chian y Sirard, 1995 ; Eppig y cols, 1996). Existen reportes sobre la existencia de fallas en la síntesis de proteínas durante la maduración de ovocitos extrafoliculares en condiciones *in vitro*. Es probable que la síntesis de proteínas nuevas durante las últimas etapas de la maduración, estén relacionadas con eventos como la fertilización y desarrollo embrionario temprano, ya que se ha demostrado que ovocitos madurados en el folículo en condiciones *in vitro* presentan una mayor tasa de maduración y desarrollo embrionario que ovocitos madurados fuera del folículo (Moor y Trounson, 1977).

### **1.2.a Maduración Citoplásmica y Activación.**

La activación en ovocitos de mamíferos se caracteriza por una serie de oscilaciones de calcio u ondas repetitivas de calcio liberado durante varias horas, una vez que el espermatozoide ha penetrado al ovocito para promover la reacción cortical y otros cambios asociados con el control de los eventos meióticos (Homa y cols, 1993; Macháty y cols, 1997).

Se ha considerado que los eventos de la activación dependen o están coordinados con los eventos iniciales de la maduración nuclear. Por ejemplo la sensibilidad al  $IP_3$  del sistema liberador de calcio intracelular se adquiere durante la maduración nuclear; así, la capacidad del ovocito para llevar a cabo la liberación de gránulos corticales inducido por la penetración del espermatozoide se adquiere antes de que ocurra la MI, pero la liberación de estos gránulos corticales en forma de onda al momento de la fertilización sólo ocurre cuando

el espermatozoide entra al ovocito entre la MI y MII (Eppig y cols, 1994 ; Eppig y cols, 1996 ; Macháty y cols, 1997).

Se ha reportado que en ovocitos de ternera no existen este tipo de oscilaciones de calcio al momento de la fertilización, mientras que en los de vaca sí se presentan, por lo que el grado de maduración citoplásmica del ovocito es un factor determinante para que se lleve a cabo la activación durante la fertilización (Damiani y cols, 1996).

### **1.2.b Maduración Citoplásmica y Fertilización.**

El desarrollo no sincronizado del pronúcleo (PN) de la hembra y el macho y el retraso o transformación anormal de la cabeza del espermatozoide en el PN durante el proceso de fertilización puede ser el resultado de la deficiencia de factores citoplasmáticos en el ovocito (Sirard y cols, 1995).

Se ha observado que existe un incremento en el grado de fertilización de los ovocitos de cerdo con respecto a su estado de madurez (VG y MI), en donde la principal señal anormal de la fertilización es la incapacidad de la cabeza del espermatozoide para formar un PN, ésto sugiere que la incorporación del material de la VG al citoplasma del ovocito es necesario para que la cabeza del espermatozoide se transforme en el PN (Motlik y Fulka, 1974). Así mismo, estudios realizados en ratón han reportado que la formación del PN masculino falla si el ovocito es fertilizado poco antes o al momento de la liberación del primer cuerpo polar. Estos estudios indican que tanto la RVG como la síntesis de proteínas durante la maduración nuclear son probablemente esenciales para activar algunos aspectos críticos de la maduración citoplásmica, particularmente aquellos relacionados con la activación y fertilización (Eppig, 1996).

Por otro lado, se conoce que el patrón de proteínas sintetizadas por los ovocitos durante la maduración tiene cambios cuantitativos y cualitativos hasta que la meiosis se detiene en MII. Algunos de éstos cambios regulan la maduración nuclear y otros la maduración citoplásmica. Por ejemplo, la inhibición de la síntesis de proteínas durante

estados críticos de la maduración nuclear afecta la formación del PN masculino (Eppig, 1996). Sin embargo, un estudio realizado en ratón reporta que el grado de formación de PN masculino fué igual de eficiente en ovocitos detenidos en MI como en MII, y, aunque se ha observado que el patrón de síntesis de proteínas es diferente en ovocitos en MI y ovocitos en MII, el hecho de que no se haya afectado la formación del PN masculino en estos ovocitos, indica que el progreso de la maduración citoplásmica no es afectado por el arresto de la maduración nuclear en MI (Eppig y cols, 1994).

De ésta manera se ha pensado que los cambios citoplásmicos necesarios para la formación del pronúcleo masculino fallan durante la maduración espontánea de los ovocitos, y que una causa potencial de ésta falla podría ser una inadecuada producción de ciertas moléculas involucradas en los procesos relacionados con la formación del PN masculino, lo cual sugiere que los factores que regulan la maduración citoplasmática y que permitirán la formación del PN masculino también pueden estar involucrados en la maduración nuclear.

### **1.2.c Maduración Citoplásmica y *Desarrollo Embrionario*.**

La capacidad de desarrollo embrionario de los ovocitos de mamíferos es menor en aquellos que provienen de folículos antrales pequeños que aquellos cuya procedencia es de folículos antrales grandes, lo cual refleja una deficiencia que ocurre durante la maduración citoplásmica *per se* o en el almacenamiento de RNAm o proteínas que se producen durante el desarrollo del ovocito (Eppig, 1993 ; Lonergan y cols, 1994). Así, la producción de proteínas y RNAm en el ovocito son sin duda críticos para el desarrollo hasta la preimplantación.

Algunas de éstas proteínas son producidas durante la maduración nuclear y son consideradas como productos de la maduración citoplásmica que se inicia al momento del reinicio de la maduración nuclear.

Un estudio realizado en ratón reporta que los ovocitos fertilizados en estado de VG adquieren la capacidad de llevar a cabo el desarrollo embrionario a dos células mientras que

aquellos que fueron fertilizados después de la RVG fueron capaces de desarrollarse hasta el estado de blastocisto (Eppig, 1996). Así mismo, se ha demostrado que la capacidad meiótica del ovocito de cerdo en cultivo coincide con la terminación de la actividad transcripcional del núcleo durante el crecimiento, además de que los ovocitos con un crecimiento completo son competentes para desarrollarse a embriones después de la fertilización; esto puede indicar que el factor limitante para un adecuado desarrollo embrionario se acumula hasta en una concentración crítica al final de la fase de crecimiento del ovocito (Motlik y cols, 1984 ; Sirard y cols 1995).

## **2. DESARROLLO DEL PRONÚCLEO MASCULINO**

Al momento de la fertilización cuando el espermatozoide entra al citoplasma del ovocito, éste lleva a cabo una serie de cambios morfológicos mientras se transforma en el PN masculino. Estos cambios morfológicos, que lleva a cabo el núcleo del espermatozoide se realizarán a través de la interacción de su cromatina con los componentes citoplásmicos del ovocito (Borsuk, 1991).

Análisis moleculares indican que el primer cambio en el procesamiento del núcleo del espermatozoide es la ruptura de la envoltura nuclear, lo cual permite que se lleven a cabo cambios en la cromatina como la ruptura de los puentes disulfuro de las protaminas y la degradación parcial de otras proteínas nucleares que se encuentran unidas a DNA del espermatozoide, dando lugar al proceso que se conoce como descondensación (Rodman y cols, 1984 ; Perreault y cols, 1987). De ésta forma, las protaminas del espermatozoide son reemplazadas por proteínas histonas y no histonas durante la formación del PN (Rodman y cols, 1981 ; Montag y cols, 1992). Posterior al reemplazo de las proteínas nucleares sigue un período corto de condensación de cromatina y, por último, la formación de una nueva envoltura nuclear para dar lugar al PN masculino (Borsuk, 1991 ; Maleszewski, 1995).

Se ha sugerido que varios factores nucleares son necesarios para inducir los cambios citoplasmáticos que promueven el desarrollo del PN masculino y que éstos factores son

liberados durante la RVG. A su vez, también se ha descrito que el factor promotor del PN masculino es sintetizado conforme los ovocitos progresan del estado de VG al estado de MII (Szöllösi y cols, 1990 ; Borsuk, 1991 ; Ding y cols, 1992b). Se ha descrito en otros estudios que durante el proceso de la fertilización ocurren cambios en la fosforilación de proteínas específicas y que los cambios asociados con la formación del PN masculino son dependientes de la fosforilación de éstas proteínas (Ding y cols, 1992a y 1992b ; Chian y Sirard, 1996).

La descondensación de la cromatina del espermatozoide se lleva a cabo por la reducción de los enlaces disulfuro de las protaminas asociadas al DNA. Se ha considerado por algunos estudios tanto moleculares como de microscopía electrónica que el glutatión ( $\gamma$ -glutamilcisteínilglicina) es el principal agente descondensante que se encuentra en el ovocito (Reyes y cols, 1989 ; Sutovsky y Schatten, 1997). La concentración de éste tiol en el ovocito varía de acuerdo a su estado fisiológico, por ejemplo, es baja en ovocitos en estado de VG y fertilizados, mientras que durante la MII se encuentra en niveles máximos (Perreault y cols, 1988).

Se ha observado que la síntesis del glutatión se lleva a cabo durante las primeras 24 h de cultivo durante la MIV en el ovocito de cerdo (Yoshida, 1993), y algunos estudios han demostrado que el bloqueo de la producción de glutatión durante la maduración del ovocito en varias especies previene la adquisición de la actividad descondensante del ovocito sobre el núcleo del espermatozoide, afectándose por lo tanto la formación del PN masculino (Calvin y cols, 1986 ; Perreault y cols, 1988 ; Yoshida, 1993).

Por otro lado, se ha demostrado que el grado de formación del PN masculino también está regulado por la actividad de la Histona H1 cinasa en el ovocito (Naito y cols, 1992, y que al igual que el glutatión existen variaciones en la actividad de ésta enzima de acuerdo con el estado fisiológico del ovocito. La actividad de esta enzima se encuentra disminuída en ovocitos en estado de VG y después se incrementa durante las etapas de MI y

MII (Naito y cols, 1992), mientras que también se ha observado que disminuye después de la fertilización (Kikuchi y cols, 1995).

Se ha propuesto que la ruptura de la envoltura nuclear y la organización de una nueva envoltura para la formación del PN masculino está regulada por la actividad de una proteína cinasa. En un estudio se demostró que la cinasa p34<sup>cdc2</sup> (componente activo de la Histona H1 cinasa), es la responsable de la fosforilación de las lamininas, proteínas que forman parte de la envoltura nuclear y cuya fosforilación es necesaria para su desensamblaje (Peter y cols, 1990 ).

Recientemente se ha reportado que existe una clara relación entre la concentración del glutatión y la actividad de la Histona H1 cinasa durante la maduración in vitro del ovocito. En este estudio se ha propuesto que la concentración del glutatión puede regular la actividad de la Histona H1 cinasa estimulando la síntesis de proteínas en el ovocito que pueden regular la actividad de la Histona H1 cinasa (Funahashi y cols, 1996).

## II. ANTECEDENTES

Algunos de los mayores inconvenientes de la técnica de FIV en especies domésticas es la baja incidencia de fertilización, la asincronía en la formación del PN masculino y femenino, así como también el pobre desarrollo embrionario en etapas tempranas.

En el caso del cerdo se ha reportado en varios estudios que el grado de fertilización, formación del PN masculino y desarrollo embrionario es menor en aquellos ovocitos madurados en condiciones *in vitro* comparados con aquellos madurados *in vivo* (Leman y Dziuk, 1971 ; Motlík y Fulka, 1974 ; Nagai y cols, 1988). Se ha propuesto que una de las principales causas de la baja incidencia y retraso de la formación del PN masculino en el ovocito madurado *in vitro* es una deficiente maduración citoplásmica del mismo (Iritani y cols, 1978 ; Nagai y cols, 1984 ; Wang y cols, 1991).

Algunos estudios han descrito que las condiciones de cultivo empleadas para la MIV de los ovocitos de cerdo pueden influenciar tanto el grado de fertilización como el desarrollo embrionario temprano (Nagai, 1994).

De ésta forma se ha recurrido a modificar los medios de maduración para mejorar la maduración citoplásmica en el ovocito mediante la adición de componentes foliculares (Mattioli y cols, 1988 ; Kikuchi y cols, 1993 ; Freeman y cols, 1995 ; Abeydeera y cols, 1998a), aminoácidos y péptidos (Yoshida y cols, 1992a ; Yoshida y cols, 1993a ; Grupen y cols, 1995 ; Ka y cols, 1997), hormonas (Mattioli y cols, 1991 ; Funahashi y Day, 1993a), y líquidos biológicos (Naito y cols, 1988 ; Yoshida y cols, 1990 ; Funahashi y Day, 1993b).

Entre algunos de los líquidos biológicos utilizados, está el líquido folicular, el cual representa un trasudado del plasma más secreciones de las células de la granulosa y de la teca interna producidas dentro del folículo durante la maduración del mismo (Edwards, 1974). Su utilización dentro de la reproducción animal ha sido básicamente como suplemento de los medios de maduración, en técnicas de FIV en especies de importancia ganadera (Sun y cols, 1994 ; Ocaña-Quero, 1994 ; Romero-Arredondo y Seidel Jr., 1996 ; Abeydeera y cols, 1998a).

Algunos estudios han demostrado que el efecto del líquido folicular en el medio de maduración depende del tipo y tamaño del folículo del cual procede. De esta forma se ha reportado que tanto el líquido folicular de cerdo como de bovino procedente de folículos intermedios y grandes contienen los factores activos para promover el desarrollo del ovocito (Naito y cols, 1990 ; Sirard y cols, 1995 ; Carolan y cols, 1996). A su vez, también se ha observado que el líquido folicular de bovino proveniente de folículos atrésicos aun contiene el potencial para promover el desarrollo en el ovocito madurado *in vitro* (Carolan y cols, 1996). Naito, (1990) ha establecido que los factores efectivos del líquido folicular que promueven la maduración citoplásmica del ovocito no son especie específicos y que se encuentran en el líquido folicular de muchas especies manteniendo sus funciones fisiológicas.

Por otro lado Naito y cols (1988) reportaron que la adición de líquido folicular de cerdo al medio de maduración en una concentración de 5 % fue suficiente para mejorar la formación del PN masculino en el ovocito de cerdo y en un trabajo posterior demostraron que la adición del líquido folicular al medio de maduración mejora la capacidad de desarrollo del ovocito de cerdo (Naito y cols, 1989).

En otro estudio donde se comparó el efecto del suplemento del medio de maduración con distintos líquidos biológicos sobre la formación del PN masculino en el ovocito de cerdo, se encontró que el líquido folicular fue el más eficiente al compararse con el suero fetal de ternera y el plasma seminal (Funahashi y Day, 1993b).

Yoshida y cols, reportaron el uso de una fracción del líquido folicular de cerdo de 10-200 kDa en el medio de maduración. Este estudio demostró que los ovocitos madurados *in vitro* en presencia de ésta fracción presentaron un alto porcentaje de formación del PN masculino y fueron capaces de desarrollarse completamente cuando se transfirieron a una hembra, lo que denotó en los ovocito una adecuada maduración citoplásmica (Yoshida y cols, 1993b).

Se ha reportado la purificación parcial de sustancias del líquido folicular que mejoran la maduración nuclear, la formación del PN masculino y el desarrollo embrionario de los ovocitos de cerdo fertilizados *in vitro* (Yoshida y cols, 1990 ; Naito y cols, 1990 ; Yoshida y cols, 1992b ; Daen y cols, 1994).

En un estudio donde se obtuvieron dos fracciones del líquido folicular de cerdo por medio de ultrafiltración, la fracción >25 kDa presentó un efecto estimulador sobre la formación del PN masculino cuando se adicionó al medio de maduración, mientras que la fracción <12 kDa tuvo un efecto inhibitorio sobre la formación del PN masculino. Así mismo, este estudio demostró que los factores del líquido folicular que promueven la formación del PN masculino son estables a 56 °C / 30 min (Naito y cols, 1990).

Dos años mas tarde Yoshida y cols, realizaron un estudio sobre los factores del líquido folicular de cerdo que promueven la expansión de las células cúmulus, la maduración nuclear y formación del PN masculino. En este estudio se demostró que los factores que promueven la formación del PN masculino no son de carácter lipídico, y son estables a 56 °C / 30 min. Así mismo, utilizando dos sistemas cromatográficos además de la ultrafiltración, se determinó que los factores que promueven la formación del PN masculino son sustancias acídicas cuyo peso molecular varía de 10 a 200 kDa (Yoshida y cols, 1992).

En un estudio reciente se logró fraccionar el líquido folicular de cerdo utilizando la ultracentrifugación. Con este método fue posible obtener tres fracciones del líquido folicular de las cuales se encontró que la primera de ellas presentó actividad estimuladora sobre la formación del PN masculino. Esta fracción fue posteriormente separada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y se encontraron dos subfracciones promotoras de la formación del PN masculino, sin describir aun más las características de éstas subfracciones. En éste mismo estudio la primera fracción obtenida por ultracentrifugación fué dializada a través de membranas de 10 kDa, 25 kDa y 50 kDa, encontrándose que la fracción obtenida por la membrana de 25 kDa fue la que presentó mayor actividad sobre la formación del PN masculino (Daen y cols, 1994).

De ésta forma es claro que la naturaleza del(los) factor(es) del líquido folicular de cerdo que regulan la maduración citoplásmica del ovocito y que promueve(n) la formación del PN masculino aun no está bien determinada. En este estudio nos ha parecido interesante comprobar si éste(os) factor(es) es(son) de naturaleza proteica y si su peso molecular se encuentra entre los 0-100 kDa.

### III. JUSTIFICACION

El desarrollo de técnicas de FIV en animales de granja, tiene un gran potencial tanto en la investigación básica para la embriología como en la aplicación práctica para la producción animal. Algunos reportes han demostrado la pobre viabilidad de embriones obtenidos por FIV seguida de una transferencia embrionaria, debido a los bajos índices de gestación y a las camadas de tamaño pequeño.

Algunos de los principales problemas de la FIV en cerdos son debidos a las condiciones de cultivo desde el inicio de la MIV del ovocito y a la polispermia.

Actualmente el proceso mediante el cual se lleva a cabo la maduración citoplasmática del ovocito y los factores que lo regulan en el folículo no están muy bien comprendidos debido a la complejidad del ambiente folicular. Aunque algunos estudios recientes han demostrado que el líquido folicular de cerdo tiene efectos benéficos sobre la MIV del ovocito y su subsecuente desarrollo embrionario después de la FIV los resultados obtenidos hasta ahora son muy ambiguos, por lo que ésto hace necesario más estudios para identificar la(s) substancia(s) activa(s) del líquido folicular que promueven la maduración citoplasmática para determinar su mecanismo de acción sobre el ovocito.

## **IV. HIPOTESIS**

Si el(los) factor(es) promotor(es) de la formación del PN masculino en el ovocito de cerdo fertilizado es(son) de naturaleza proteica, entonces el tratamiento de éste(os) con una proteasa inhibirá su efecto.

## V. OBJETIVOS

### GENERAL :

Demostrar la naturaleza proteica del(los) factor(es) del liquido folicular de cerdo que promueve(n) la maduración citoplásmica del ovocito de cerdo.

### PARTICULARES :

1. Separar en subfracciones la fracción de 0-100 kDa del líquido folicular de cerdo.
2. Evaluar el efecto de las subfracciones obtenidas de la fracción de 0-100 kDa sobre la formación del PN masculino en el ovocito fertilizado.
3. Estudiar el efecto del tratamiento con una proteasa de la(s) subfracción(es) promotoras de la formación del PN masculino en el ovocito fertilizado.

## VI. MATERIAL Y METODOS

### 1. OBTENCION Y FRACCIONAMIENTO DEL LÍQUIDO FOLICULAR DE CERDO.

El líquido folicular de cerdo se obtuvo de ovarios de cerdas prepúberes, los cuales se colectaron en un rastro local (ABC, Los Reyes, Edo. de México); se transportaron al laboratorio en una solución de cloruro de sodio (J.T. Baker, México) al 0.9 % a 15 °C. El tiempo transcurrido entre la colecta y la llegada al laboratorio fue de aproximadamente 2 h. Los ovarios se enjuagaron por lo menos tres veces en una solución de cloruro de sodio al 0.9 % a 15 °C, antes de ser procesados. El líquido folicular se obtuvo mediante punción de los folículos de 2-5 mm de diámetro con una aguja de 21x32 mm adaptada a una jeringa desechable de 3 ml 1Norm-Ject (Henke-Sass, Alemania), el cual fue depositado en un tubo de centrifuga de poliestireno de 110 x 16 mm (Nunc, Dinamarca).

El líquido folicular se centrifugó a 1500 g durante 30 minutos a 4 °C en una centrifuga GS-15R (Beckman, Irvine CA) para eliminar los restos celulares. Posteriormente, el líquido se decantó en un vaso de precipitado de vidrio y se midió el volumen. Se filtró a través de membranas de 1.2  $\mu\text{m}$ , 0.8  $\mu\text{m}$  y 0.45  $\mu\text{m}$  tipo HA (Millipore, Bedford, MA) y finalmente se almacenó en refrigeración a -70 °C en un ultracongelador Revco (Rheem Manuf. Co., Asheville, NC) hasta el momento de su fraccionamiento.

#### 1.1 Obtención de la fracción de 0-100 kDa.

Se ultrafiltraron 20 ml del líquido folicular con una membrana Diaflo de sello de 100 kDa (Amicon, Beverly, MA) en una unidad de filtración Amicon 8010 con agitación magnética (Amicon) en frío y con una presión de nitrógeno de 25 psi. Durante el proceso de ultrafiltración se realizaron 3 lavados del líquido folicular, agregando una cantidad de Tris-HCl (Sigma, St. Louis Mo.) 0.05 M pH 8.0 prefiltrado por membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  de tipo HA (Millipore), hasta diluir el líquido folicular al 50 % durante el proceso de ultrafiltración. De ésta forma se colectaron 21 ml de la fracción de 0-100 kDa del líquido folicular los

cuales se congelaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su separación por cromatografía de intercambio iónico.

## **1.2 Cromatografía de Intercambio Iónico de la Fracción de 0-100 kDa.**

La fracción de 0-100 kDa del líquido folicular se fraccionó mediante cromatografía de intercambio iónico (González, 1997) en un cromatografo de líquidos de baja presión Biologic (BioRad, Hercules, CA), utilizando una columna Econo-Pac Mono Q (BioRad). Las condiciones de separación se manejaron a través del programa de Biologic v. 1.30 (Biorad) . El día de la separación se cargó la columna con los componentes de la fracción de 0-100 kDa, haciendo pasar el volumen del ultrafiltrado a un flujo de 1 ml/min. La separación de los componentes retenidos por la columna se realizó mediante un gradiente de 0 a 400 mM de una solución de cloruro de sodio (Sigma) 1 M, en amortiguador Tris-HCl (Sigma) 0.05 M pH 8.0 prefiltrado con una membrana de  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  tipo HA (Millipore) a un flujo de 1 ml/min y con un incremento de salinidad de 1.3 %/min. Se colectaron fracciones de 1 ml en tubos ependorf de polipropileno de 2 ml, las cuales se mantuvieron en frío durante todo el proceso.

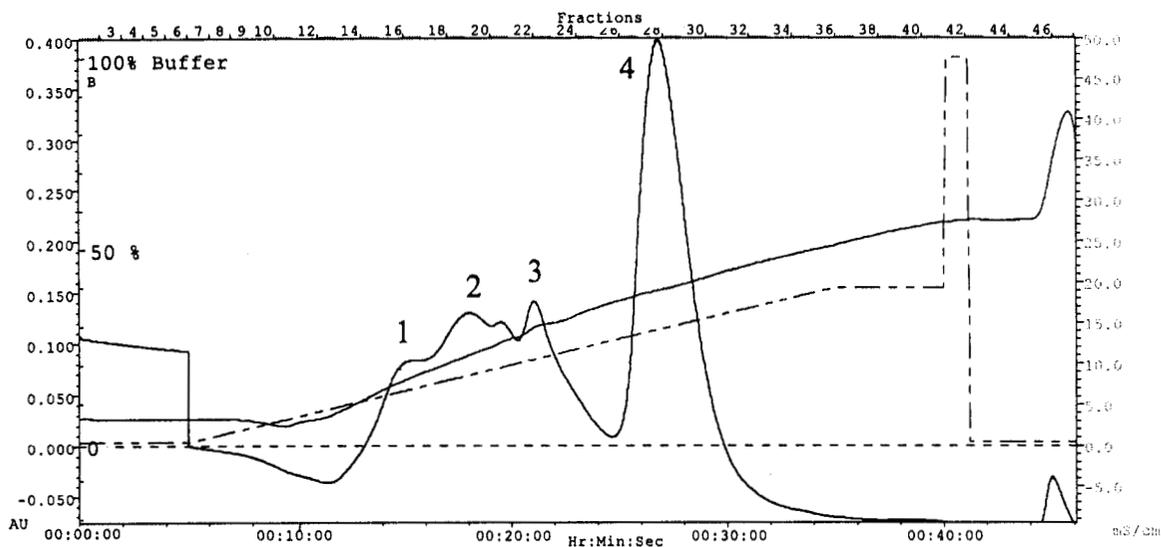
Una vez que se obtuvo el cromatograma se mezclaron las fracciones correspondientes a cada uno de los picos obtenidos (Fig. 1) :

P1 (fracción 15-17)

P2 (fracción 18-21)

P3 (fracción 22-26)

P4 (fracción 27-31).



**Fig. 1. Cromatografía de intercambio iónico de la fracción de 0-100 kDa del líquido folicular de cerdo con una columna Mono Q.**

Cada uno de los picos obtenidos se dializó en una membrana Spectrapor (Spectrum Medical Ind., Houston TX) con sello de 12-14 kDa contra 1 lt de agua desionizada, realizando 2 cambios del agua en un período de 72 h y mantenidos en refrigeración.

Terminada la diálisis, se colectó el contenido de cada pico en un tubo de vidrio de 70x10 mm y se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la liofilización.

La liofilización de cada pico (P1, P2 ,P3 y P4) se realizó en una liofilizadora Labconco Mod. 75250 (Equipar S.A. de C.V., México). Las condiciones de trabajo de la liofilizadora fueron a una temperatura de  $-50^{\circ}\text{C}$  y a una presión de vacío de 0.025 Torr. Terminada la liofilización de las muestras, se suspendieron en un volumen igual al del líquido folicular del cual partieron (20 ml), con medio Krebs-Ringer con Bicarbonato (KRB) sin suplementar (Davis y Day, 1978). Posteriormente se prepararon alícuotas de 1 ml en tubos endorf de poliestireno de 2 ml para su almacenamiento a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso en la MIV de los ovocitos.

## **2. MADURACION Y FERTILIZACIÓN *in vitro*.**

La técnica de MIV y FIV de los ovocitos se realizó según Betancourt y cols (1993). El manejo de las células y la preparación de los medios de cultivo para la MIV y la FIV se realizó bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar (Veco, México) a 30-35°C. Todos los medios de cultivo se esterizaron por filtración con un filtro Millex-GV (Millipore) de 0.22 µm y se preincubaron por lo menos 2 horas antes de utilizarse para el cultivo en una incubadora Lab-Line (Lab-Line, Inst. ILL) con 5 % de CO<sub>2</sub>, 95 % de aire y humedad saturada a 37 °C.

### **2.1 Obtención de los Complejos Ovocitos-Cúmulus (COC's).**

Se colectaron ovarios de cerda prepúberes de un rastro local (ABC, Los Reyes, Edo. de México) los cuales se transportaron al laboratorio en solución salina (J.T. Baker) al 0.9 % a 38 °C. El tiempo de colecta y transporte no fué mayor a 2 h. Los ovarios se enjuagaron tres veces en solución salina al 0.9 % a 38 °C antes de la obtención de los COC's. Los COC's se obtuvieron bajo condiciones de esterilidad mediante punción de los folículos de 2-5mm de diámetro con una aguja de 21x32 mm adaptada a una jeringa desechable de 3 ml 1Norm-Ject (Henke-Sass, Alemania). El líquido folicular junto con los COC's se depositaron en un tubo de fondo cónico de polibutadienoestireno de 15 ml (Nunc). Ahí se dejó transcurrir por lo menos 15 minutos para permitir la sedimentación de los COC's junto con los restos celulares de los folículos. Posteriormente se recuperaron los sedimentos de los tubos mediante aspiración con una pipeta Pasteur de 225 mm (Brand, Alemania) estéril, los cuales se depositaron en una caja de petri de plástico estéril de 60x15 mm (S y M Laboratorios, México). Los COC's se seleccionaron bajo un microscopio estereoscópico (Zeiss, Alemania) mediante aspiración con una pipeta Pasteur estéril alargada y se eligieron para el estudio aquellos COC's rodeados de varias capas de células cúmulus (Fig 2).

## 2.2 Maduración de los COC's.

Para la MIV de los COC's se formaron seis grupos de estudio ; 2 grupos control : KRB (control negativo), Líquido Folicular de Cerdo (LFC) (control positivo) y 4 grupos experimentales : P1, P2, P3 y P4 (subfracciones de la cromatografía de intercambio iónico liofilizadas y suspendidas en KRB).

La preparación de los medios de maduración (KRB, LFC, P1, P2, P3 y P4) consistió en suplementar cada uno de ellos con 4 mg/ml de BSA Fracción V (Sigma), 0.25 mM de Piruvato de Sodio (Sigma), 2 UI/ml de LH y 2 UI/ml de FSH (Pergonal) (Lab. Serono, México), 10 µg/ml de Gentamicina (Yectamicina) (Schering, México) y 1µg/ml 17β-Estradiol (Sigma). Posteriormente se ajustó el pH a cada uno de los medios a 7.4.

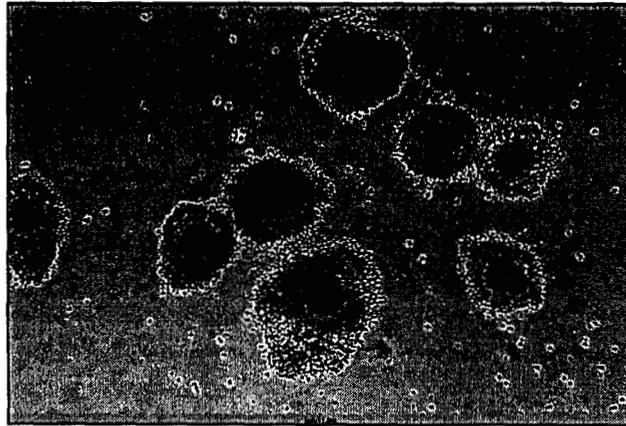
Los COC's se enjuagaron por aspiración con la ayuda de una pipeta Pasteur alargada, tres veces en 100 µl con su respectivo medio de maduración preincubado. Se colocaron de 15-20 COC's en una gota de 100 µl de medio de maduración en cajas de cultivo de cuatro pozos estéril Nunclon™ (Nunc) donde previamente se ha colocado por pozo una gota de 100 µl de cada uno de los medios de maduración (por duplicado) y las cuales se han cubierto con aceite mineral para cultivo (Sigma) precalentado a 37 °C y previamente equilibrado (Bavister, 1989). Finalmente se incubaron los COC's bajo las condiciones ya mencionadas durante 48 h. Transcurrido éste tiempo, se observó que las células cúmulus de los COC's se expandieron (Fig.2).

## 2.3 Fertilización de los Ovocitos.

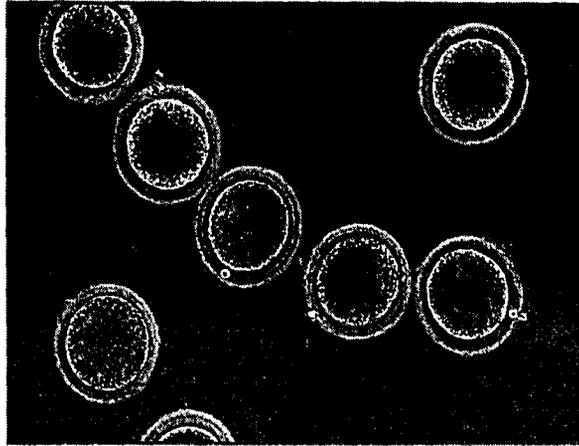
### *Preparación de los Ovocitos.*

El día de la fertilización se suplementó el medio de fertilización Tyrode sin HEPES (TALP) (Bavister y Yanagimachi 1977) con 6 mg/ml de BSA libre de ácidos grasos (Sigma), 0.25 mM de Piruvato de Sodio (Sigma) y 10 µg/ml de Gentamicina (Schering), se ajustó el pH a 7.4.

La preparación de los ovocitos consistió en la eliminación de las células cúmulus expandidas de los COC's mediante aspiración con una pipeta Pasteur alargada, en una gota de 100  $\mu$ l del medio de fertilización suplementado y preincubado (Fig. 3). Los ovocitos se enjuagaron tres veces en gotas de 100  $\mu$ l del mismo medio y se colocaron de 15-20 ovocitos en una gota de 100  $\mu$ l de medio de fertilización cubierta con aceite mineral en una caja de cultivo de cuatro pozos, en donde se mantuvieron en incubación hasta el momento de la fertilización.



**Fig. 2. Complejos Cúmulus-Ovocitos (COC's).** La imagen representa a los COC's madurados *in vitro* durante 48 h en donde se aprecia la expansión de las células cúmulus. Aumento original 100 X.



**Fig.3 Ovocitos libres de células cúmulus.** La imagen representa a los ovocitos después de 48 h de maduración *in vitro* a los cuales se les ha eliminado las células cúmulus. En algunos de ellos es posible apreciar el cuerpo polar como signo de la maduración nuclear. Aumento Original 200 X.

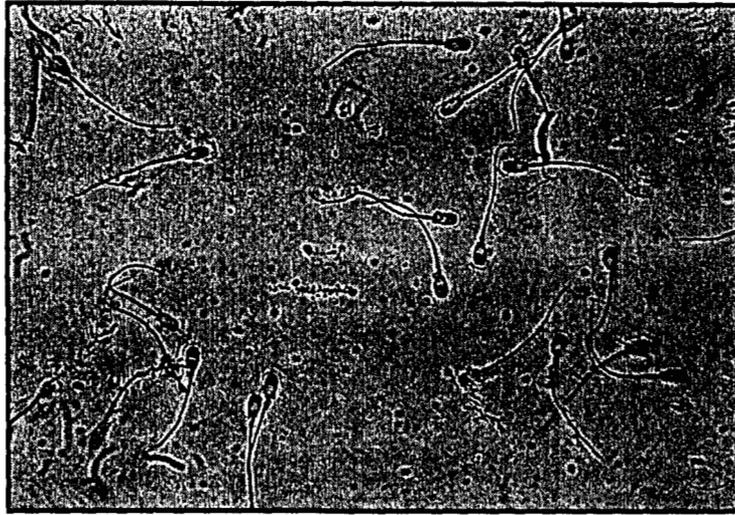
### ***Capacitación de Espermatozoides.***

La muestra de semen se obtuvo de un solo cerdo de la raza Yorkshire en la granja Tomacoco (Amecameca, México), mediante el método de la mano enguantada y se transportó al laboratorio a una temperatura de 39 °C. Al llegar la muestra al laboratorio se evaluó la movilidad y concentración de la misma .

La movilidad se determinó mediante la observación de un campo de espermatozoides a 250X en un microscopio invertido Olympus M021(Olympus Optical, Japan) realizando una estimación del número de espermatozoides móviles en el campo. La muestras utilizadas para la fertilización presentaron una movilidad de 80-90 %.

La concentración de espermatozoides se determinó realizando una dilución 1:200 con ácido acético al 2 % de la muestra y por medio del conteo de espermatozoides en una Cámara de Neubauer (Brand, Alemania) a un aumento de 250X en un microscopio compuesto (Zeiss, Alemania) se calculó la cantidad de espermatozoides por ml de semen.

La concentración de las muestras de semen utilizadas durante este estudio fué de 100-200 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml (Fig.4).



**Fig. 4 Espermatozoides de Cerdo.** En la imagen se muestran los espermatozoides de cerdo teñidos con Eosina-Y. Aumento original 400 X.

El medio utilizado para la capacitación de los espermatozoides fué el Tyrode con HEPES (TALP-HEPES) (Bavister y Yanagimachi, 1977), el cual se suplementó el día de uso con 6 mg/ml de BSA Fracción V (Sigma), 1 mM de Piruvato de Sodio (Sigma) y 10 µg/ml de Gentamicina (Schering), se ajustó el pH a 7.8. Los espermatozoides se capacitaron en una caja de cultivo de 4 pozos colocando por pozo una concentración de  $32 \times 10^6$  cel/ml e incubándolos con 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de aire a 37 °C por un lapso de 4 h.

#### ***Co-cultivo de Ovocitos y Espermatozoides.***

Finalizado el periodo de capacitación de los espermatozoides, se inseminó cada uno de los pozos con ovocitos con una concentración de  $5.0 \times 10^5$  espermatozoides/ml. La fertilización se llevó a cabo en la incubadora con 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de aire a 37 °C durante 18 h. Transcurrido éste tiempo se procedió a eliminar los espermatozoides adheridos a la ZP de los ovocitos mediante aspiración con una pipeta pasteur alargada en 100 µl de medio de fertilización y se enjuagaron dos veces con el mismo medio antes de colocarse en el fijador.

### ***Fijación de los Ovocitos fertilizados.***

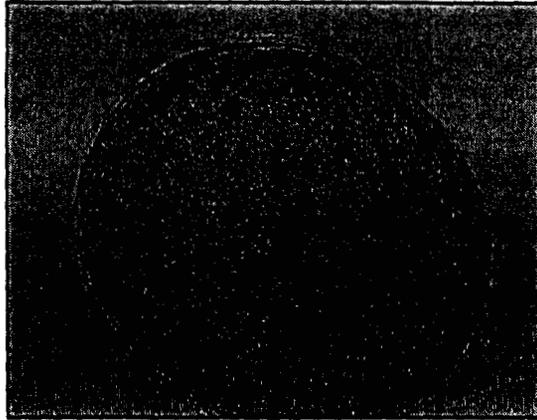
Los ovocitos lavados se colocaron en cajas de cultivo de 4 pozos con fijador de Carnoi recién preparado (metanol-ácido acético 3:1 v/v) y se mantuvieron en él por lo menos durante 48 h en refrigeración antes de ser evaluados.

#### **2.4. Evaluación de la Maduración y Fertilización.**

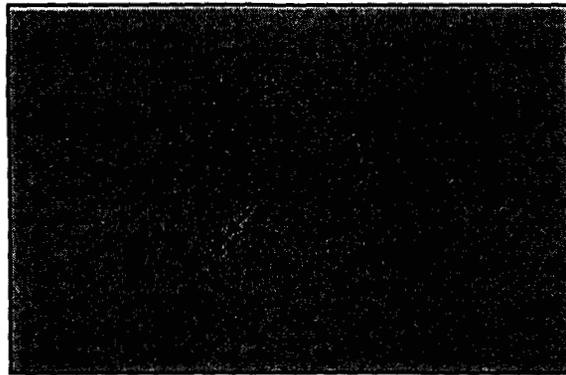
La evaluación se realizó mediante la tinción de los ovocitos con orceína (Sigma) preparada al 1 % en ácido acético glacial (Técnica Química, S.A, México). Los ovocitos teñidos se observaron en un microscopio compuesto (Zeiss, Alemania) a campo claro con un aumento de 400X y 1000X.

La tinción de los ovocitos se realizó colocando aproximadamente 5 ovocitos en un portaobjetos y cubriéndolos con un cubreobjetos soportado en sus cuatro esquinas con vaselina para permitir el deslizamiento del colorante sobre la preparación. La tinción se llevó a cabo en un lapso de 1-3 minutos y después se observaron al microscopio.

Los criterios de evaluación para la maduración y fertilización fueron los siguientes : Ovocitos no madurados nuclearmente, aquellos que presentaron una VG (Fig. 5), Ovocitos madurados nuclearmente, los que presentaron juegos de cromosomas en MI (Fig. 6 ) ó en MII (con o sin la presencia de un cuerpo polar)(Fig.7). Ovocitos fertilizados, aquellos que presentaron una cabeza de espermatozoide descondensada junto con los cromosomas del ovocito ya sea en MI o MII (Fig. 8) ó aquellos con la presencia de un PN masculino junto con cromosomas metafásicos del ovocito (Fig.9).



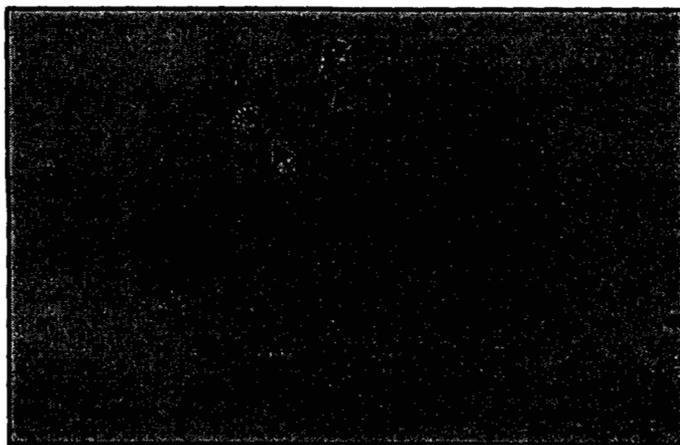
**Fig. 5 Ovocito Inmaduro nuclearmente.** La imagen muestra a un ovicto con la presencia de la vesícula germinal (flecha), lo cual indica que no reinició la meiosis. Aumento original 400 X.



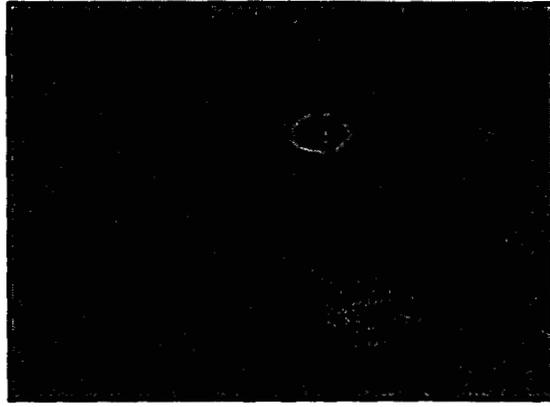
**Fig. 6. Ovocito en estado de Metafase I.** La imagen muestra a un ovocito en estado de Metafase I, en el cual se muestra el arreglo característico de los cromosomas en esta etapa (flecha). Aumento original 400 X.



**Fig. 7. Ovocito en Metafase II.** En esta imagen se muestra el arreglo cromosómico de un ovocito en Metafase II. Se distinguen los cromosomas ordenados en el plano metafásico (flecha larga) y los cromosomas correspondientes al cuerpo polar recién formado (flecha corta). Aumento original 1000 X.



**Fig. 8. Ovocito fertilizado con una descondensación.** En la imagen se muestra a un ovocito con la cromatina de un espermatozoide descondensada (punta de flecha), y en el mismo se aprecian los cromosomas del ovocito (flecha). Aumento original 400 X.



**Fig. 9. Ovocito fertilizado con un Pronúcleo masculino.** En la imagen se muestra a un pronúcleo masculino (flecha corta), y los cromosomas del ovocito en etapa de MII (flecha larga).  
Aumento original 1000 X.

### **3. ANALISIS DE PROTEÍNAS DE LAS SUBFRACCIONES DEL LÍQUIDO FOLICULAR DE CERDO.**

#### **3.1 Electroforesis en PAGE-SDS.**

Las subfracciones P1, P2, P3 y P4 obtenidas de la cromatografía de intercambio iónico se analizaron mediante una electroforesis unidimensional en gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato de Sodio (PAGE-SDS) (Laemmli, 1970).

Se determinó la concentración de proteínas de cada una de las subfracciones, así como también de la fracción 0-100 kDa y del líquido folicular completo por el método de Lowry (1951) para su posterior análisis mediante electroforesis.

Para la electroforesis se preparó un gel de separación al 15 % junto con un gel de compactación al 4 % a partir de una solución de Acrilamida-Bisacrilamida (37.5:1) (Bio-Rad). La cantidad de muestra que se colocó por carril fue de 10  $\mu$ g de proteína y la separación de las proteínas se realizó en una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN II (Bio-Rad) a voltaje constante de 200 volts durante 45 minutos. Se realizaron dos electroforesis, una para el análisis de las bandas de proteínas con la tinción de Azul de Coomassie y la otra para el análisis de las bandas de proteínas con la tinción de Nitrato de Plata (Oakley y cols, 1980).

### ***Tinción con Azul de Coomassie***

El gel de poliacrilamida se fijó en un volumen de 200 ml de fijador metanol-ácido acético-agua (50:10:40) durante 1 hora con agitación suave. En seguida se colocó el gel en 200 ml de una solución de Azul de Coomassie R-250 (J.T. Baker) al 0.1 %, preparada en metanol-ácido acético (40:10) y se mantuvo en agitación suave durante 1 hora. Finalmente el gel se decoloró en 200 ml de una solución de metanol-ácido acético-agua (30:7.5:62.5) durante toda la noche y al día siguiente se secó a temperatura ambiente en papel celofán.

### ***Tinción con Nitrato de Plata.***

Para la tinción con plata el segundo gel se fijó en un volumen de 400 ml de una solución de isopropanol 10%-ácido acético 10 % (v/v) durante toda la noche y al día siguiente el gel se sumergió en una solución acuosa de glutaraldehído (Sigma) al 10 % durante 1 hora. Posteriormente se eliminó el fijador mediante el lavado del gel con tres cambios de agua deionizada durante 1 hora.

En seguida se preparó una solución de plata amoniacal en campana de extracción. Se mezclaron 21 ml de hidróxido de sodio (J.T. Baker) al 0.36 % y 1.4 ml de hidróxido de amonio (J.T. Baker), a ésta mezcla se agregaron 4 ml de nitrato de plata (Técnica Química) al 20 % gota a gota hasta su completa disolución. Se ajustó el volumen a 100 ml con agua desionizada. El gel se sumergió en la solución de plata amoniacal durante 15 minutos, se eliminó esta solución con la ayuda de una pipeta Pasteur y se lavó el gel con agua desionizada durante 2 minutos.

Para revelar la tinción del gel, se sumergió en un revelador recién preparado con 300 ml de agua desionizada, 30 mg de ácido cítrico (Sigma) y 150 µl de formaldehído (J.T. Baker) al 37 %. El patrón de proteínas comenzó a aparecer a partir de los 5 minutos y el revelado se detuvo agregando una solución de ácido acético al 10 %. Finalmente el gel se secó a temperatura ambiente en celofán.

### **3.2 Análisis de Geles por Densitometría.**

Cada uno de los geles se analizó por densitometría utilizando el programa Molecular Analyst™/PC v.1.0 (Bio-Rad), con el cual fue posible obtener los perfiles de cada uno de los carriles correspondientes a las subfracciones de la cromatografía de intercambio iónico. Se

calculó la movilidad relativa de cada una de las bandas con respecto a los estándares de peso molecular de 6.5-200 kDa (Bio-Rad) y finalmente se integró el análisis de ambos geles para calcular el número total y movilidad relativa de las bandas presentes en cada una de las subfracciones en estudio.

#### **4. DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS DE LA SUBFRACCIÓN P4.**

Para evaluar el efecto de las proteínas de la subfracción P4 se realizó la digestión de las proteínas con la Proteinasa K, (Daen y cols 1994). En esta parte del estudio se formaron cuatro grupos: KRB (control negativo), P4 (control positivo), KRB + Proteasa (control de digestión) y P4 + Proteasa.

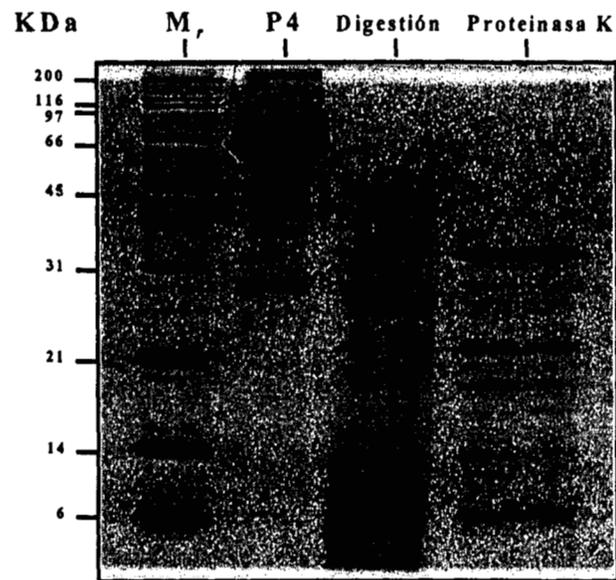
Tanto la subfracción P4 como el control de digestión se incubaron con 5 µg/ml de Proteínasa K (GibcoBRL, Scotland) a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente la fracción digerida y su control se calentaron a 100 °C en baño de agua durante 15 minutos para inactivar a la enzima.

Posteriormente, tanto los medios digeridos como los no digeridos se suplementaron con los componentes ya descritos en la sección de MIV de ovocitos. Se continuó con la técnica de MIV y FIV de los ovocitos y la evaluación de la maduración nuclear y fertilización se realizó con los parámetros ya descritos en la sección de evaluación de la MIV y FIV de los ovocitos.

Para comprobar la digestión total de las proteínas de la subfracción P4 se realizó una electroforesis en PAGE-SDS (Laemmli, 1970) al 15 % del digerido (Fig. 10)

#### **5. ANALISIS ESTADÍSTICO.**

Los resultados obtenidos tanto de la maduración nuclear, como de la fertilización fueron analizados mediante la prueba de  $\chi^2$ .



**Fig. 10. Electroforesis en PAGE-SDS de la subfracción P4 digerida con 5  $\mu\text{g/ml}$  de **Proteinasa K**. Se observa en la imagen que las proteínas de la subfracción P4 se degradaron, y sólo se observa la banda correspondiente a la **Proteinasa K**.**

## VII. RESULTADOS

### 1. OBTENCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DEL LÍQUIDO FOLICULAR DE CERDO.

A partir de aproximadamente 100 ovarios se recuperó la cantidad de 30 ml de líquido folicular, el cual mostró una concentración de proteína de 72 mg/ml. Al momento de la ultrafiltración del líquido folicular a través de una membrana de sello de 100 kDa se recuperaron 20 ml del filtrado de 0-100 kDa, la cual mostró tener una cantidad total de proteína de 9.22 mg.

Posteriormente, los 20 ml del filtrado de 0-100 kDa del líquido folicular se sometieron a un segundo fraccionamiento por cromatografía de intercambio aniónico en una columna Mono Q utilizando un gradiente de salinidad de 0 a 400 mM; durante la separación se obtuvieron cuatro picos, correspondientes cada uno de ellos a las cuatro subfracciones en estudio (P1, P2, P3 y P4) (Fig. 1).

Las subfracciones de la cromatografía, correspondientes a cada uno de los picos se recuperaron en frío, se dializaron contra agua desionizada durante 72 h y, finalmente se liofilizaron. Cada una de las subfracciones liofilizadas se resuspendieron en medio KRB en un volumen igual al del líquido folicular del cual partieron y una vez suspendidas en el medio se les cuantificó la concentración de proteína, encontrándose 13.32, 30.69, 51.94 y 54.65  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente para las subfracciones P1, P2, P3 y P4.

### 2. MADURACIÓN NUCLEAR.

Después de 48 h de cultivo, durante el cual se llevó a cabo la MIV de los ovocitos, se observó que en todos los grupos de estudio ocurrió la expansión de las células cúmulus en los COC's (Fig.2), lo cual denotó también la síntesis de ácido hialurónico por las células cúmulus. La expansión de las células cúmulus se apreció de manera visual y fue posible observar que en el grupo del LFC hubo un mayor extendimiento de las capas de las células cúmulus así como también una mayor síntesis de ácido hialurónico, debido a la gran

dificultad que se presentó para eliminar las células cúmulus mediante el enjuague de los ovocitos, a diferencia de los demás grupos de estudio.

Cuando se evaluó la maduración nuclear de los ovocitos incubados en presencia del líquido folicular y sus subfracciones, se observó que la RVG en todos los grupos de estudio fué de entre el 89 al 99%, no existiendo diferencia estadística entre el control negativo y los grupos de las subfracciones con respecto al grupo LFC (Cuadro 1).

Al realizar el análisis de la progresión de la maduración nuclear de los ovocitos ya sea en MI ó en MII, se encontró que entre un 10 y 20 % de ovocitos se encontraban en MI en los grupos KRB, P1, P2, P3, y P4, mientras que en el grupo del LFC se observó un alto porcentaje (40%) de ovocitos arrestados en MI lo cual fue estadísticamente diferente comparado con todos los demás grupos (Cuadro 1). Por otro lado la progresión de los ovocitos en MII fue de 85, 82, 86, 80, 90 y 60% para los grupos KRB, P1, P2, P3, P4 y LFC respectivamente. El análisis estadístico reveló que el grupo LFC fué significativamente menor al compararse con los demás grupos (Cuadro 1).

**Cuadro. 1 Maduración Nuclear en ovocitos de cerdo madurados *in vitro* con LFC y sus Subfracciones.**

Tratamiento	No. de Ovocitos (%)			
	Total	RVG	MI	MIH
KRB	79	74(94)	11(15) <sup>b</sup>	63(85) <sup>b</sup>
P1	94	85(90)	15(18) <sup>b</sup>	70(82) <sup>b</sup>
P2	94	84(89)	12(14) <sup>b</sup>	72(86) <sup>b</sup>
P3	92	85(92)	17(20) <sup>b</sup>	68(80) <sup>b</sup>
P4	99	96(97)	10(10) <sup>b</sup>	86(90) <sup>b</sup>
LFC	91	90(99)	36(40) <sup>a</sup>	54(60) <sup>a</sup>

Análisis Estadístico : Prueba de X<sup>2</sup>, p < 0.05

<sup>ab</sup> Valores dentro de la misma columna con diferentes letras son significativamente diferentes.

El total de ovocitos corresponde a 3 experimentos.

### 3. FERTILIZACIÓN.

El porcentaje de fertilización se calculó con base en el número de ovocitos con RVG que presentaron ya sea una cabeza de espermatozoide descondensada ó un PN masculino. En éste parámetro evaluado se observaron distintos efectos de las subfracciones del líquido folicular.

Los grupos KRB (27%) y P3 (27%) no presentaron ninguna diferencia con respecto al grupo del LFC (23%), sin embargo si se observó un efecto negativo del P1 sobre la fertilización cuando se comparó con el grupo del LFC (15% vs 23%) lo cual fué estadísticamente significativo. Los grupos P2 (33%) y P4 (39%) mostraron un efecto positivo sobre el incremento de la fertilización cuando se compararon con el grupo de LFC (23%) (Cuadro 2).

Cuando se analizó el porcentaje de ovocitos fertilizados con presencia de PN masculino se encontró que el grupo KRB presentó un 70%, lo cual fue significativamente menor que lo observado en el grupo del LFC (100%). Sin embargo, los grupos P1 (69%) y P2 (75%) mostraron un efecto similar sobre la formación del PN masculino cuando se compararon con el KRB (70%), pero fueron menores al compararse con el grupo LFC (100%). Por otro lado se observó que el grupo del P3 (59%) tuvo un efecto negativo sobre la formación del PN masculino cuando se comparó con el KRB (70%) y LFC (100%). El único grupo que mostró un efecto similar al del LFC fue el del P4 (100% vs 95%) (Cuadro 2 y Fig.11).

**Cuadro. 2 Fertilización en ovocitos madurados *in vitro* con LFC y sus Subfracciones.**

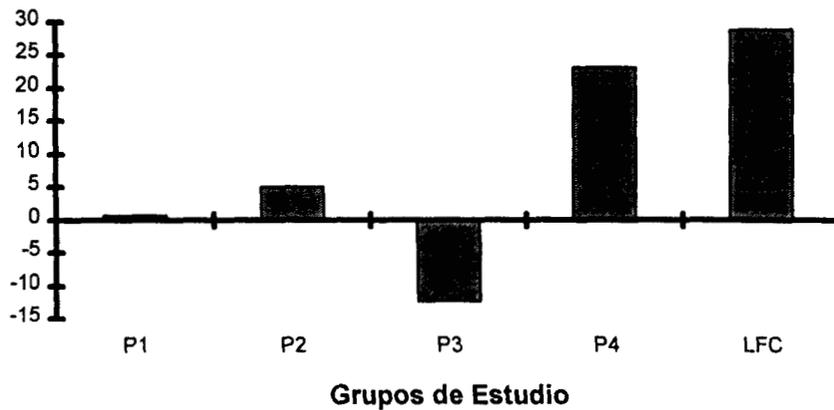
Tratamiento	No. de Ovocitos (%)		
	Ovocitos con RVG	Fertilizados	PN Masculino
KRB	74	20(27) <sup>a</sup>	14(70) <sup>b</sup>
P1	85	13(15) <sup>b</sup>	9(69) <sup>b</sup>
P2	84	28(33) <sup>b</sup>	21(75) <sup>b</sup>
P3	85	22(27) <sup>a</sup>	13(59) <sup>b</sup>
P4	96	37(39) <sup>b</sup>	35(95) <sup>a</sup>
LFC	90	20(23) <sup>a</sup>	20(100) <sup>a</sup>

Análisis Estadístico : Prueba de  $\chi^2$  ,  $p < 0.05$

<sup>ab</sup> Valores dentro de la misma columna con diferentes letras son significativamente diferentes.

El total de ovocitos con RVG corresponde a 3 experimentos.

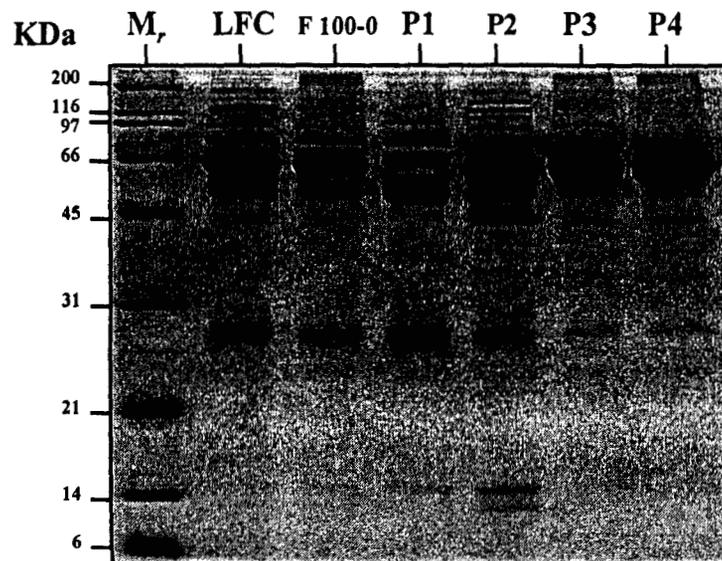
**% de Estímulo**



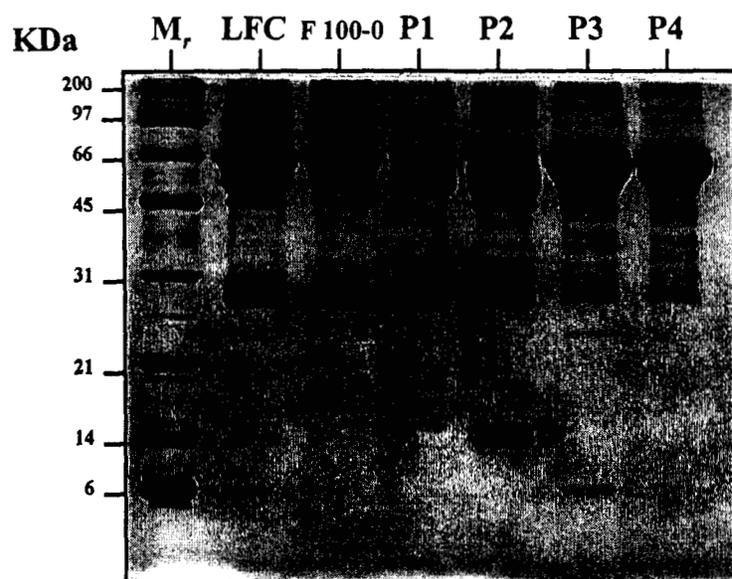
**Fig. 11. Estímulo del Líquido Folicular y sus Subfracciones sobre la formación del Pronúcleo Masculino en ovocitos fertilizados *in vitro*.** En ésta gráfica se observa como la subfracción P3 del líquido folicular de cerdo tiene un estímulo negativo sobre la formación del PN masculino, mientras que la subfracción P4 del líquido folicular de cerdo muestra un estímulo parecido al del LFC al compararse todos los grupos con el grupo KRB.

#### 4. ANALISIS DE PROTEÍNAS DE LAS SUBFRACCIONES DEL LÍQUIDO FOLICULAR DE CERDO.

Se realizaron dos electroforesis en PAGE-SDS de las distintas subfracciones del líquido folicular (P1, P2, P3, y P4), una de ellas se reveló con la tinción de Azul de Coomassie y la otra con Nitrato de Plata. Cada una de las tinciones mostró diferentes patrones de bandas de proteínas en las diferentes subfracciones (Fig. 12 y 13).



**Fig.12 Electroforesis en PAGE-SDS del líquido folicular de cerdo y sus fracciones.** La tinción de las bandas de proteínas se realizó con Azul de Coomassie, en esta imagen se observan distintos patrones de bandas en las subfracciones del líquido folicular de cerdo.



**Fig.13 Electroforesis en PAGE-SDS del líquido folicular de cerdo y sus fracciones.** La tinción de las bandas de proteínas se realizó con Nitrato de Plata, en esta imagen se observan distintos patrones de bandas en las subfracciones del líquido folicular de cerdo y se pueden distinguir algunas de bajo peso molecular que no se observaron con la tinción de Azul de Coomassie.

Posteriormente por medio de densitometría se analizaron los geles de las electroforesis con ambas tinciones, para determinar la masa molecular relativa ( $M_r$ ) de las bandas de proteínas presentes en cada una de las subfracciones. Con éste análisis se encontró que la subfracción P1 presentó 11 bandas cuyos  $M_r$  oscilaron entre 85 y 14 kDa; la subfracción P2 mostró 15 bandas cuyos  $M_r$  fueron de 96 a 11 kDa; mientras que la subfracción P3 presentó 13 bandas con  $M_r$  que variaron de 96 a 6 kDa y la subfracción P4 que fue la que mostró actividad estimulante sobre la formación del PN masculino mostró 8 bandas con una  $M_r$  que varió de 80 a 28 kDa (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Masa Molecular Relativa de Proteínas del Líquido Folicular de Cerdo y de sus Subfracciones obtenidas por Cromatografía de Intercambio Iónico.**

<b>M<sub>r</sub></b>	<b>LFC</b>	<b>F 100-0</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>
160-150	160					
149-140	146					
139-130						
129-120						
119-110	119					
109-100	104					
99-90	93	96		96, 90	96	
89-80		86	85	85	80	80
79-70	78	74	73	78, 70		
69-60	64, 62	65, 60	63	66, 64	63	
59-50	58, 53	54	58, 55	57, 53	59, 56, 52	56, 54
49-40	47, 41	48, 41	43, 40	46	46, 40	45
39-30	39	36	35	34, 30	37, 36, 34	38, 35, 33
29-20	27	29	29, 28	27	29	28
19-10	13	18, 17	14	13, 11		
9-0					6	
<b>TOTAL DE BANDAS</b>	<b>15</b>	<b>12</b>	<b>11</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>8</b>

### 5. EFECTO DE LA DIGESTION DE PROTEÍNAS DE LA SUBFRACCIÓN P4.

Debido a que la subfracción P4 del líquido folicular de cerdo fue la que presentó actividad estimulante sobre la formación del PN masculino, se eligió a ésta para probar el efecto de las proteínas de ésta subfracción sobre la formación del PN masculino. De ésta forma, se procedió a desnaturalizar las proteínas con una proteasa y probar el efecto de la digestión sobre la MIV del ovocito.

Los resultados obtenidos revelaron que cuando se desnaturalizaron las proteínas en la subfracción P4 (P4 +PK) no se alteró el porcentaje de maduración nuclear al compararse con la subfracción P4 no tratada con la proteasa (P4) (95% vs 95%). Así mismo tampoco la fertilización fue diferente entre ambos grupos (24% vs 28%); sin embargo, si hubo una

diminución en el grado de formación de PN masculinos con la digestión de las proteínas de la subfracción P4 cuando se comparó con el grupo P4 (64% vs 100%) (Cuadro 4).

Por otro lado se encontró que en el control del tratamiento para la digestión de proteínas (KRB + PK) no se presentaron diferencias en cuanto a la maduración nuclear cuando se comparó con el grupo de KRB (90% vs 92%), en la fertilización (28% vs 30%) y en la formación del pronúcleo masculino (69% vs 72%) (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Efecto de la hidrólisis de la Subfracción P4 sobre la Maduración y Fertilización *in vitro* en ovocitos de cerdo.**

Tratamiento	No. de Ovocitos (%)			
	Total	RVG	Fertilizado	PN Masculino
1. KRB	64	59(92)	18(30)	13(72)
2. KRB + PK	62	56(90)	16(28)	11(69)
3. P4	66	63(95)	18(28)	18(100)*
4. P4 + PK	61	58(95)	14(24)	9(64)*

Análisis Estadístico : Prueba de  $X^2$ ,  $p < 0.05$

Se compararon los siguientes grupos de los tratamientos : 1 vs 2; 3 vs 4; 2 vs 4; No hubo diferencias significativas en ninguna de las comparaciones de la fertilización y PN masculino, sólo hubo diferencias entre 3 vs 4 (\*) en la formación de PN masculinos.

El total de ovocitos representa a 2 experimentos.

## VIII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudió el efecto del líquido folicular de cerdo y sus fracciones sobre la maduración y fertilización del ovocito de cerdo en condiciones *in vitro*.

### 1. EXPANSION DE CÉLULAS CUMULUS.

Después de 48 h de cultivo durante la MIV de los ovocitos se observó que hubo una adecuada expansión de las células cúmulus de los COC's en todos los grupos de estudio, sin embargo en el grupo LFC se observó que hubo un mayor grado de expansión de dichas células, con respecto a los demás grupos.

En algunos estudios se ha sugerido que la expansión de las células cúmulus es un indicador morfológico de una adecuada maduración nuclear del ovocito en condiciones *in vitro*. Sin embargo, otros estudios han demostrado que la expansión de éstas células y la maduración nuclear no son totalmente dependientes una de la otra (Yoshida y cols, 1989 ; Abeydeera y cols, 1998b). La expansión de las células cúmulus se debe, principalmente, a la síntesis de ácido hialurónico por las mismas células. Ésta síntesis del ácido hialurónico es debida al estímulo tanto de factores parácrinos derivados del ovocito como del líquido folicular (Nakayama y cols, 1996). En el cerdo, se ha demostrado que la presencia de FSH en el medio de maduración promueve la expansión de las células cúmulus (Yoshida y cols, 1989), mientras que, en el ratón, es necesaria la acción sinérgica tanto de la LH como de la FSH para la expansión de las células cúmulus (Chen y cols, 1994).

Es posible que la adecuada expansión de las células cúmulus observada en todos los grupos de estudio se deba a que los medios de maduración empleados en este estudio fueron suplementados con gonadotrofinas (LH y FSH).

Se ha reportado que el líquido folicular incrementa el grado de expansión de las células cúmulus y la maduración del ovocito en cerdos y vacas (Naito y cols, 1988; Yoshida y cols, 1992b ; Romero-Arredondo y Seidel, 1994). Yoshida y cols (1992b) encontraron la presencia de sustancias termoestables en el líquido folicular de cerdo que promueven la

expansión de las células cúmulus. Este efecto lo encontraron en la fracción de >200 kDa y de 10-200 kDa del líquido folicular de cerdo cuando las probó por separado a cada una de ellas. Daen y cols, (1994) también han reportado que el líquido folicular de cerdo contiene un factor termoestable con una  $M_r$  <6.5 kDa que promueve la expansión de las células cúmulus.

El alto grado de expansión de las células cúmulus mostrado en el grupo LFC de éste estudio, tal vez se deba a que en el líquido folicular completo se encontraba la fracción de alto y bajo peso molecular reportadas por Yoshida y cols (1992b). Se puede suponer que en la fracción de >200 kDa del líquido folicular se encuentran los sustratos necesarios para la síntesis del ácido hialurónico como la D-glucosamina y en la fracción de 10-200 kDa los factores del líquido folicular que tienen un papel regulador junto con el ovocito para la síntesis del ácido hialurónico.

## **2. MADURACIÓN NUCLEAR.**

Los resultados obtenidos sobre la maduración nuclear en este estudio son similares a lo reportado por otros investigadores (Naito y cols, 1988; Yoshida y cols, 1989 ; Naito y cols, 1990 ; Mattioli y cols, 1991). En todos los grupos de estudio el porcentaje de maduración nuclear o RVG obtenido osciló en todos los grupos de un 92 a 99% y, al realizar el análisis del grado de maduración alcanzado por los ovocitos, se encontró que a las 48 h de cultivo alcanzaron de un 10-20% en MI y de un 80-90% en MII.

Se ha establecido que el líquido folicular tanto de cerda como de vaca, tienen un efecto inhibitorio sobre la maduración nuclear del ovocito (Tsafiri y Channing, 1975 ; Lipford y cols, 1978 ; Naito y cols, 1988 ; Dostál y Pavlok, 1996), a su vez, se ha demostrado que este efecto inhibitorio es dependiente del tamaño del foliculo del cual procede el líquido folicular (Lipford y cols, 1978 ; Dostál y Pavlok, 1996).

Lipford y cols (1978) lograron purificar parcialmente una fracción del líquido folicular de cerdo de <10 kDa con actividad inhibitoria, por lo que sugerieren que el factor(es) con actividad inhibitoria sobre la maduración nuclear del ovocito tiene una  $M_r$  baja. Recientemente un estudio realizado con líquido folicular de bovinos demostró que éste

factor de M<sub>r</sub> baja requiere de una proteína de 60 kDa también presente en el líquido folicular para ejercer su efecto (Dostál y Pavlok, 1996).

Sin embargo, otros estudios no han podido demostrar el efecto inhibitorio del líquido folicular de cerdo y de vaca sobre la maduración nuclear del ovocito en condiciones *in vitro* (Racowsky y McGaughey, 1982 ; Naito y cols, 1990 ; Yoshida y cols, 1992b). Se ha demostrado que la adición de gonadotrofinas al líquido folicular revierte su efecto inhibitorio sobre la maduración nuclear. Naito y cols, (1988) reportaron que el grado de maduración nuclear de los ovocitos cultivados en líquido folicular de cerdo fué de 36% y que este porcentaje se incrementó a 87% cuando se adicionaron gonadotrofinas (FSH + hCG) al líquido folicular. También se ha demostrado que la adición de gonadotrofinas al medio de maduración mejora el grado de maduración nuclear alcanzado por el ovocito. Yoshida y cols, (1989), reportan que los ovocitos cultivados después de 48 h en presencia de gonadotrofina sérica de yegua preñada (PMSG) y hCG alcanzaron hasta un 80 % en MII, mientras que Mattioli y cols, (1991) demostraron que después de 44 h de cultivo los ovocitos de cerdo cultivados en presencia de LH alcanzaron hasta un 76 % en MII y en presencia de FSH un 86 % en la misma fase, no encontrando un efecto sinérgico entre ambas gonadotrofinas.

Se ha establecido que las gonadotrofinas favorecen la RVG durante la maduración del ovocito probablemente a través de un efecto indirecto regulado por las células foliculares (Buccione y cols, 1990 ; Eppig, 1993). En el caso del ratón se cree que las gonadotrofinas pueden interrumpir la comunicación intercelular privando al ovocito de los factores que inducen el arresto meiótico, mientras que, en especies como la oveja, el cerdo y el hámster, se cree que las gonadotrofinas generan una señal inductora de la maduración por las células de la granulosa que contrarresten el efecto inhibitorio del ambiente folicular (Eppig, 1993).

Es posible que el alto porcentaje de maduración obtenido en éste estudio sea debido al efecto de las gonadotrofinas (LH y FSH) presentes en los medios de maduración. A su vez en este estudio fue sorprendente encontrar que los ovocitos madurados en el grupo LFC no alcanzaron un alto grado de maduración nuclear después de las 48 h de cultivo, ya que presentaron un 40% de ovocitos en MI y sólo un 60% lograron la progresión de la

maduración nuclear a MII. Es posible que éste efecto se deba a un arresto de la meiosis en MI o a un retraso de la misma.

Existen pocos reportes del efecto del líquido folicular sobre el arresto durante la meiosis. En un estudio realizado con líquido folicular de equino se demostró que éste tuvo un efecto inhibitorio sobre el progreso de la meiosis, ya que un 32 % de los ovocitos madurados en presencia de él se mantuvieron en arresto durante la MI al finalizar el período de MIV (Hinrichs y cols 1995).

Se ha demostrado que el arresto de la meiosis en MI de ovocitos de cabra está relacionado con la fosforilación de dos proteínas (72 y 68 kDa) (Gall y cols, 1996). Algunos cambios en la fosforilación de proteínas durante la meiosis favorecen eventos como el desensamblaje de la lámina nuclear o la condensación de la cromatina. Estos cambios también pueden estar relacionados con la expresión de la actividad del FPM o la presencia de factores como el factor citostático (CFS) que están involucrados en el arresto meiotico de los ovocitos.

Las cinasas y fosfatasas juegan un papel importante en el reinicio y progresión de la meiosis, ya que éstas enzimas regulan principalmente la actividad del FPM, la Histona H1 y las MAP cinasas (Lévesque y Sirard, 1995).

Durante la progresión de la meiosis ocurren oscilaciones en la concentración y la actividad del FPM. En el ovocito de cerdo se ha demostrado que la transición de la MI a la MII se debe a una disminución en la actividad del FPM (Motlík y cols, 1998 ; Naito y cols, 1995), sin embargo, no se ha determinado con claridad si ésta disminución de la actividad del FPM es debida a una degradación de la Ciclina B. Por otro lado, estudios realizados en ratón sugieren que la disminución de la actividad del FPM durante el paso de la MI a la MII es debida a una adecuada degradación de la Ciclina B o la inactivación de la p34<sup>cdc2</sup> (Winston, 1997). Se ha propuesto que la degradación puntual de la Ciclina B durante el proceso de la meiosis requiere de una señal apropiada de calcio por parte del ovocito ya que ciertas cinasas que participan en la inactivación del FPM son dependientes de calcio (Vitullo y Ozil, 1992 ; Winston, 1997). Estudios realizados en ovocitos de vaca y cabra han sugerido que la transición de la MI a la MII se debe a una disminución en la actividad de la

p34<sup>cdc2</sup> ó Histona H1 cinasa, así como también por el mantenimiento de la actividad de las MAP cinasa (Fissore y cols, 1996 ; Dedieu y cols, 1996).

Se ha reportado que el líquido folicular de cerdo incrementa significativamente la actividad de la Histona H1 cinasa durante la MI y MII en ovocitos de cerdo (Naito y cols, 1992). En el presente estudio es probable que aquellos ovocitos en MI del grupo LFC se encontraban en un arresto de la meiosis debido a que presentaron una mayor actividad de la Histona H1 cinasa (p34<sup>cdc2</sup>), y por lo tanto una alta actividad del FPM que no permitió el progreso de la MI a la MII.

### **3. FERTILIZACIÓN.**

En el presente trabajo se estudió, también el efecto de las 4 subfracciones (P1,P2,P3 y P4) del filtrado de 0-100 kDa del líquido folicular durante la MIV sobre la fertilización en el ovocito. La fertilización de un ovocito se determinó por la presencia de, ya sea, una cabeza de espermatozoide descondensada ó por la de un PN masculino. Se encontró que la subfracción P3 (27%) no tuvo efecto sobre la fertilización cuando se comparó con el grupo LFC (23%), en cambio la subfracción P2 (33%) y P4 (39%) presentaron un incremento en la fertilización, mientras que la subfracción P1 (15%) mostró una disminución sobre la fertilización cuando se comparó con el grupo LFC.

El efecto inhibitorio de fracciones del líquido folicular sobre la fertilización de ovocitos ya ha sido reportado. Yoshida y cols, (1992b), encontraron dos subfracciones de la fracción de 10-200 kDa del líquido folicular con efecto inhibitorio, mientras que Daen y cols, (1994) observaron éste efecto en tres fracciones del líquido folicular. En estos reportes los autores no discuten éste efecto del líquido folicular sobre la fertilización.

La baja de fertilización observada en el grupo P1 podría explicarse debido a una inadecuada maduración tanto nuclear como citoplásmica del ovocito. En éste grupo se observó que hubo una adecuada maduración nuclear (90% con RVG), pero tal vez no hayan logrado una adecuada maduración citoplásmica que facilitara la descondensación de la cromatina del espermatozoide y la formación del PN masculino. Por otro lado, podríamos

decir que en los grupos P2 y P4, en donde hubo un incremento de la fertilización, tal vez fue debido a que los ovocitos lograron tanto una buena maduración nuclear como citoplásmica.

Otra de las posibles causas que ocasionara la baja fertilización en el grupo P1, puede ser debida a una pobre unión de los espermatozoides con los ovocitos. La unión del espermatozoide con la ZP del ovocito de cerdo se realiza a través de proteínas como la proacrosina y otras de bajo peso molecular (16-23 kDa) que se han localizado en la región anterior de la cabeza del espermatozoide de cerdo (Mo y cols, 1991). Se ha demostrado que la unión de éstas proteínas con las glicoproteínas de la ZP (ZP3) puede ser inhibida por la presencia de polímeros sulfatados tales como el dextran sulfato, fucoidan, polyvinilsulfato y heparina (Jones, 1991 ; Parry y cols, 1992).

Los glicosaminoglicanos (Acido Hialurónico, Condroitin Sulfato, Dermatan Sulfato y Heparina) son polímeros sulfatados que se han encontrado en el en el líquido folicular de cerdo (Reyes y cols, 1984). Es posible que en la subfracción P1 del líquido folicular se encuentren glicosaminoglicanos que modificaron la ZP de los ovocitos, bloqueando receptores de la misma y por lo tanto ocasionando una pobre unión de los espermatozoides con los ovocitos. Sería interesante comprobar ésta hipótesis realizando estudios de unión de espermatozoides a los ovocitos tratados con ésta fracción.

#### **4. MADURACIÓN CITOPLÁSMICA. *Formación del Pronúcleo Masculino***

Se ha establecido una estrecha relación entre la maduración citoplásmica del ovocito y la formación del PN masculino, de tal forma que se ha utilizado a la formación del PN masculino como un parámetro fisiológico para evaluar dicha maduración.

En el presente estudio, al evaluar la formación del PN masculino en los diferentes grupos se encontró que la subfracción P4 tuvo un efecto estimulante sobre la formación del PN masculino cuando se comparó con el porcentaje basal obtenido en el grupo KRB (95% vs 70%), mientras que, por el contrario, se encontró que la subfracción P3 tuvo un efecto inhibitorio al compararse con el grupo KRB (59% vs 70%). Estos resultados coinciden con lo ya reportado por otros autores en donde se lograron purificar parcialmente fracciones del

líquido folicular de cerdo que tanto promueven como inhiben la formación del PN masculino en el ovocito.

Naito y cols, (1990) demostraron el efecto estimulante de una fracción de >25 kDa del líquido folicular de cerdo sobre la formación del PN masculino y también encontraron que la fracción de <12 kDa tiene un efecto negativo sobre la formación del PN masculino. Mientras tanto Yoshida y cols, (1992b) utilizando dos sistemas de cromatografía lograron demostrar que una subfracción de la fracción de 10-200 kDa del líquido folicular de cerdo presentaba actividad estimulante sobre la formación del PN masculino y que la fracción <10 kDa del líquido folicular tuvo un efecto inhibitorio sobre la formación de este. Posteriormente Daen y cols, (1994) utilizando un sistema de ultracentrifugación para fraccionar el líquido folicular demostraron que la fracción >25 kDa presentó un efecto estimulante, corroborando lo descrito por Naito y cols, (1990). Sin embargo, en este trabajo no se reporta el efecto inhibitorio del líquido folicular sobre la formación del PN masculino.

Con éstos reportes es claro que el factor(es) con actividad inhibitoria tienen una  $M_r$  baja. En el presente estudio cuando se realizó el análisis de la  $M_r$  de las bandas de proteínas de las distintas subfracciones, se encontró que la subfracción P3 fué la única que presentó una banda de  $M_r$  baja (<10 kDa). Es posible que éste factor de la subfracción P3 corresponda a los descritos en las fracciones con efecto inhibitorio reportadas por Naito y cols, (1990) y Yoshida y cols, (1992b).

En el presente estudio fué posible demostrar que los factores activos del líquido folicular que promueven la formación del PN masculino se encuentran en la fracción de 0-100 kDa del líquido folicular y particularmente en la subfracción P4 obtenida por cromatografía de intercambio iónico.

Naito y cols, (1990) reportan que el factor promotor de la formación del PN masculino que se encuentra en la fracción de >25 kDa del líquido folicular de cerdo tal vez sean glicosaminoglicanos o inhibina, mientras tanto Yoshida y cols, (1992b) concluyen que los factores que promueven la formación del PN masculino son sustancias acídicas cuya  $M_r$  está entre los 10-200 kDa y descarta la posibilidad de que sean glicosaminoglicanos. Por otra parte Daen y cols, (1994) sólo llegan a demostrar que los factores del líquido folicular

que promueven la formación del PN masculino tienen una  $M_r > 25$  kDa y que éstos no son los mismos que promueven la expansión de las células cúmulus.

Se ha descrito que en el ovocito de mamíferos, una adecuada maduración citoplásmica requiere de la síntesis de proteínas específicas durante la maduración nuclear del mismo (Gosden y cols, 1997). Así mismo, en el ovocito de cerdo se han reportado cambios importantes en la síntesis de dos proteínas (25 kDa y 46 kDa) durante la transición de la RVG a la MII y se ha demostrado que la inhibición de la síntesis de proteínas durante la maduración nuclear afecta la formación del PN masculino (Ding y cols, 1992a y 1992b). Por otro lado, en ovocitos de vaca también se han descrito cambios importantes en la síntesis de proteínas (110 kDa, 27-28 kDa y 39 kDa) durante la maduración nuclear (Wu y cols, 1996). De ésta forma se ha establecido que la síntesis del factor promotor de la formación del PN masculino comienza inmediatamente después de que el ovocito ha alcanzado la MI y éste alcanza sus máximos niveles en la MII (Ding y cols, 1992b).

Sin embargo, también se ha demostrado que en ovocitos de cerdo y de vaca la síntesis de proteínas durante la fertilización no es necesaria para la formación del PN masculino. Se ha observado que existen cambios postraduccionales importantes en las proteínas para el desarrollo del PN masculino (Ding y cols, 1992a y 1992b ; Chian y Sirard, 1996); entre éstos cambios postraduccionales se ha demostrado en el ovocito de cerdo, que al momento de la formación del PN masculino ocurren cambios en la desfosforilación de una proteína de 25 kDa (Ding y cols, 1992a). En cambio, en el ovocito de vaca se han descrito dos proteínas específicas (75 kDa y 47 kDa) como responsables de la formación del PN masculino (Chian y Sirard, 1995) mientras que en el ovocito de ratón se ha demostrado que ocurre la fosforilación de un complejo proteico de 35 kDa durante la formación del PN masculino (Howlett, 1986).

Se ha reportado que las células foliculares participan tanto en la síntesis como en la fosforilación de proteínas específicas en el ovocito (Colonna y cols, 1989 ; Chian y Sirard, 1995), de tal forma que se ha propuesto que las células de la granulosa juegan un papel importante en la regulación de la actividad de las proteínas cinasas en el ovocito.

Así mismo, se ha demostrado que las células foliculares juegan un papel importante en la maduración citoplásmica del ovocito de cerdo y vaca (Ding y cols, 1988 , Chian y

Niwa, 1994 ; de Matos y cols, 1997) promoviendo la formación del PN masculino. Ding y cols, (1988) reportan que el efecto de éstas células sobre el ovocito de cerdo, sólo es posible cuando en el medio de cultivo están presentes hormonas gonadotróficas. Por otro lado Mattioli y cols, (1991) demostraron que al adicionar LH al medio de maduración se incrementó el porcentaje de PN masculino, a diferencia de cuando se utilizó FSH en el medio. En éste mismo trabajo también se demostró que la LH estimula la interacción intercelular entre las células cúmulus y el ovocito. De ésta forma, se ha propuesto que tal vez esta comunicación prolongada entre las células cúmulus y el ovocito por efecto de las gonadotrofinas favorezca la maduración citoplásmica del ovocito.

En el presente estudio se utilizaron gonadotrofinas (LH y FSH) para suplementar los medios de maduración, por lo que tal vez esto explique que se haya logrado obtener un considerable porcentaje (70%) de formación de PN masculino en el control negativo (KRB).

Por otro lado, se ha demostrado que el líquido folicular de cerdo incrementa la actividad de la Histona H1 cinasa en el ovocito de cerdo durante la maduración nuclear y que esto a su vez está correlacionado con un incremento en la formación del PN masculino (Naito y cols, 1992). Funahashi y cols, (1996) en un estudio reciente demostraron que existe una clara relación entre la actividad de la Histona H1 cinasa y la concentración de glutatión en el ovocito durante la MIV del ovocito de cerdo. Así mismo, se ha demostrado que la síntesis de glutatión durante la maduración del ovocito es necesaria para la descondensación de la cromatina del espermatozoide (Yoshida, 1993 ; de Matos y cols, 1997), mientras que también se ha demostrado que es necesaria una alta actividad de la Histona H1 cinasa para la eliminación de la envoltura nuclear (Peter y cols, 1990).

## **5. LIQUIDO FOLICULAR Y MADURACIÓN DEL OVOCITO.**

En el presente estudio se demostró que el(los) factor(es) activo(s) de la subfracción P4 del líquido folicular es(son) de naturaleza protéica, ya que al digerir las proteínas de la subfracción con una proteasa, disminuyó su efecto promotor (64 % P4 + PK vs 100 % P4).

Al realizar el análisis del patrón electroforético de la subfracción P4 se encontraron ocho bandas de proteínas (80, 56, 54, 45, 38, 35, 33 y 28 kDa). Resultaría importante realizar una electroforesis de tipo bidimensional de éstas bandas de proteínas para una caracterización mas detallada de las proteínas de la subfracción P4.

El líquido folicular está compuesto por secreciones del folículo y por exudados del plasma sanguíneo. Su composición refleja cambios en los procesos secretores de las células de la granulosa y de la teca interna del folículo así como modificaciones en los componentes del plasma debido a los procesos fisiológicos. Las propiedades y componentes del líquido folicular de varias especies han sido descritos (Edwards, 1974), y algunos de los componentes (iones, aminoácidos, lípidos, lipoproteínas, enzimas y glucosa) del líquido folicular de cerdo se han descrito en los diferentes estados de desarrollo del folículo (Chang y cols, 1976 ; Delgado y cols, 1992).

Se ha demostrado que los patrones electroforéticos de las proteínas del líquido folicular de cerdo y vaca son muy similares (Cabrera y cols, 1985), y que estos cambian durante el desarrollo del folículo debido a la síntesis de diferentes proteínas (Cabrera y cols, 1985 ; Reyes y cols, 1990 ; Khatir y cols, 1997).

En diversos estudios se ha demostrado la presencia de factores de tipo proteico en el líquido folicular que participan en la maduración folicular y maduración del ovocito (Nandedkar y cols, 1996 ; Arici y cols, 1997 ; Kawano y cols, 1997 ; Gérard y cols, 1998), de tal forma que se ha propuesto utilizar los patrones electroforéticos de las proteínas del líquido folicular como un indicador del grado de maduración del ovocito (Spitzer y cols, 1996).

Por otro lado, existen estudios donde se ha demostrado el efecto de algunos factores de tipo proteico identificados en el líquido folicular que tienen efecto sobre la maduración del ovocito (Gómez y cols, 1993 ; Coskun y Lin, 1994 ; Silva y Knight, 1998 ; Izadyar y cols, 1998).

El efecto de las gonadotrofinas y del EGF sobre la maduración del ovocito han sido ampliamente estudiados. En el caso del ovocito de cerdo y de vaca, las gonadotrofinas y el EGF tienen un efecto similar sobre la maduración nuclear del ovocito. En cambio, se ha observado que las gonadotrofinas son capaces de promover la formación del PN masculino,

mientras que el EGF sólo presenta un efecto sinérgico con ellas sobre éste fenómeno (Ding y Foxcroft, 1994 ; Kobayashi y cols, 1994). Se ha propuesto que, tanto las gonadotrofinas como el EGF, actúan a través de las células foliculares modulando la secreción de progesterona y estradiol en el folículo. Sin embargo no se descarta la idea de que actúen junto con otros factores foliculares para promover la maduración citoplásmica del ovocito.

Estudios realizados en vacas han demostrado que el EGF promueve la fosforilación de proteínas en los ovocitos y células cúmulus, las cuales tal vez jueguen un papel importante en la maduración nuclear y citoplásmica del ovocito. Así mismo, se ha logrado demostrar un efecto directo del EGF sobre el ovocito, estimulando la síntesis de proteínas durante la maduración del ovocito (Lévesque y Sirard, 1995 ; Lonergan y cols, 1996). Es por ello que se ha propuesto al EGF como uno de los factores foliculares importantes que regulan los eventos de la maduración nuclear y citoplásmica del ovocito en el folículo.

Los mecanismos que gobiernan el proceso de maduración del folículo y la influencia de éste sobre la maduración del ovocito aun no han sido esclarecidos totalmente. Durante éstos procesos participan un gran número de factores, los cuales interactúan entre sí para generar las señales adecuadas para la maduración del ovocito.

Es posible que el(los) factor(es) de la subfracción P4 del líquido folicular de cerdo que promueven la formación del PN masculino actúe(n) en sinergia con las gonadotrofinas a través de las células cúmulus o directamente sobre el ovocito regulando ya sea la síntesis o la fosforilación de proteínas específicas en el ovocito necesarias para la formación del PN masculino.

Resultaría interesante conocer el mecanismo de acción de éstos factores sobre la maduración del ovocito, probando su efecto sin la presencia de gonadotrofinas y demostrando si actúan a través de las células cúmulus ó directamente sobre el ovocito. Con éste estudio es difícil saber si el efecto de la subfracción P4 se debe a un factor o al efecto de un conjunto de varios de ellos. Estudios posteriores en donde se realice una mayor purificación de los componentes de la subfracción P4 podrían dar una respuesta a ésta interrogante.

## IX. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró obtener la fracción de 0-100 kDa del líquido folicular de cerdo mediante la técnica de ultrafiltración. Así mismo, fué posible separar ésta fracción en cuatro subfracciones utilizando la técnica de cromatografía de intercambio iónico.

Se demostró que el líquido folicular de cerdo presenta diversos efectos sobre la maduración y fertilización del ovocito. Algunos de éstos efectos sólo se apreciaron cuando se fraccionó el líquido folicular, mientras que otros se mostraron cuando se utilizó el líquido folicular completo. Entre estos efectos se encontró que el líquido folicular completo estimula una mayor expansión de las células cúmulus durante la MIV de los ovocitos, tiene un efecto negativo sobre el progreso de la meiosis y promueve la formación del PN masculino. Mientras tanto, cuando se utilizaron las fracciones de < 100 kDa del líquido folicular durante la MIV de los ovocitos, se encontró una fracción con efecto inhibitorio sobre la fertilización, otra fracción que estimula la formación del PN masculino, así como también una que lo inhibe.

Así mismo, en este estudio se demostró que el(los) factor(es) del líquido folicular que promueve(n) la formación del pronúcleo masculino son de naturaleza proteica y que los métodos de fraccionamiento del líquido folicular utilizados no modificaron la actividad biológica del(los) mismo(s).

## X. PERSPECTIVAS

1. Demostrar si la subfracción P1 afecta la unión de los espermatozoides con el ovocito.
2. Determinar si el efecto inhibitorio de la subfracción P3 sobre la formación del PN masculino se debe a un factor de baja M, (<10 kDa) presente en ella.
3. Demostrar si el(los) factor(es) de la subfracción P4 actúan en sinergia con las gonadotropinas (LH y FSH) para promover la formación del PN masculino.
4. Determinar si el(los) factor(es) de la subfracción P4 actúan a través de las células cúmulus o directamente sobre el ovocito.
5. Realizar una caracterización más detallada de las ocho bandas de proteínas de la subfracción P4.

## XI. BIBLIOGRAFIA

**Abeydeera, L.R., Wang, W., Cantley, T.C, Rieke, A. y Day, B.N.** (1998a). Coculture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after in vitro fertilization: Relevance to intracellular glutathione. *Biol. of Reprod.* 58: 213-218.

**Abeydeera, L.R., Wang, W., Prather, R.S. y Day, B.N.** (1998b). Maturation in vitro of pig oocytes in protein-free culture media : Fertilization and subsequeute embryo development in vitro. *Biol. of Reprod.* 58: 1316-1320.

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

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

**Bavister, B.D.** (1989). A consistently succesful procedure for in vitro fertilization of golden hamster eggs. *Gamete Res.* 23: 139-158.

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

**Borsuk E.** (1991). Anucleate fragmentes of partenogenetic eggs and maturing oocytes contain complementary factors required for development of a male pronucleus. *Mol. Rep. Dev.* 29: 150-156.

**Buccione R., Schroeder, A.C. y Eppig, J.J.** (1990). Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol. of Reprod.* 43: 543-547.

**Cabrera, Y.O., Andino, N.V. y Mateo De Acosta, M.** (1985). Protein electrophoretic patterns of bovine and porcine ovarian follicular fluid. *J. Endocrinol. Invest.* 8: 489-493.

**Calvin, H.I., Grosshans, K. y Blake, E.J.** (1986). Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova : Relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. *Gamete Res.* 14: 265-275.

**Carolan, C., Lonergan, P., Monget, P., Monniaux, D. y Mermillod, P.** (1996). Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Mol. Rep. Dev.* 43: 477-483.

**Casas, E., Betancourt, M., Bonilla, E., Ducolomb, Y., Zayaz, H. y Trejo, R. (1998).** Changes in cyclin B localization throughout pig oocyte in vitro maturation. *Zygote. (En prensa)*.

**Chang, S.C.S., Jones, J.D., Ellefson, R.D. y Ryan, R.J. (1976).** The porcine ovarian follicle : I. Selected chemical analysis of follicular fluid at different development stages. *Biol. of Reprod. 15: 321-328.*

**Chen, L., Russell, P.T. y Larsen, W.J. (1994).** Sequential effects of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on mouse cumulus expansion in vitro. *Biol. of Reprod. 51: 290-295.*

**Chian, R.C. y Niwa, K. (1994).** Effect of cumulus cells present during different periods of culture on maturation in vitro of bovine oocytes. *Theriogenology 41: 176.*

**Chian, R.C. y Sirard, M.A. (1995).** Effects of cumulus cells and follicle stimulating hormone during in vitro maturation on parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Mol. Rep. Dev. 42: 425-431.*

**Chian, R.C. y Sirard, M.A. (1996).** Protein synthesis is not required for male pronuclear formation in bovine zygotes. *Zygote 4: 41-48.*

**Colonna, R., Cecconi, S., Tatone, C., Mangia, F. y Buccione R. (1989).** Somatic cell-oocyte interactions in mouse oogenesis : Stage-specific regulation of mouse oocyte protein phosphorylation by granulosa cells. *Dev. Biol. 133: 305-308.*

**Coskun, S. y Lin, Y.C. (1994).** Effects of Transforming Growth Factors and Activin-A on in vitro porcine oocyte maturation. *Mol. Reprod. Dev. 38: 153-159.*

**Daen, F.P., Sato, E., Naito, K. y Toyoda, Y. (1994).** The effect of pig follicular fluid fractions on cummulus expansion and male pronucleus formation in porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fert. 101: 667-673.*

**Damiani, P., Fissore, R.A., Cibelli, J.B., Longo, C.R., Balise J.J., Robl, J.M. y Duby, R.T. (1996).** Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. *Mol. Rep. Dev. 45: 521-534.*

**Davis, D.L. y Day, B.N. (1978).** Cleavage and blastocyst formation by pig eggs in vitro. *J. Anim. Science 46: 1043-1053.*

**de Matos, D.G., Furnus, C.C. y Moses, D.F. (1997).** Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes : Role of cumulus cells. *Biol. of Reprod. 57: 1420-1425.*

**Dedieu, T., Gall, L., Crozet, N., Sevellec, C. y Ruffini, S.** (1996). Mitogen-Activated Protein Kinase activity during goat oocyte maturation and the acquisition of meiotic competence. *Mol. Reprod. Dev.* 45: 351-358.

**Delgado, N.M., Carranco, A., Reyes, R., Hernández-Pérez, O. y Rosado, A.** (1992). Follicular development : Changes in the pattern of proteins/divalent cations secretions during follicular growth in the pig. *Asisted Reprod. Tech. Androl.* 3: 333-340.

**Ding, J., Nagai, T. y Moor, R.M.** (1988). Effects of follicle cells and hormones on maturation and fertilization in vitro of oocytes from immature gilts. *J. Reprod. Fert. Abst. Series (2):* 23.

**Ding, J., Clarke, N., Nagai, T. y Moor, R.M.** (1992a). Protein and nuclear changes in pig eggs at fertilization. *Mol. Rep. Dev.* 31: 287-296.

**Ding, J., Moor, R.M. y Foxcroft, G.R.** (1992b). Effects of protein synthesis on maturation, sperm penetration, and pronuclear development in porcine oocytes. *Mol. Rep. Dev.* 33: 59-66.

**Ding, J. y Foxcroft, G.R.** (1994). Epidermal Growth Factor enhances oocyte maturation in pigs. *Mol. Reprod. Dev.* 39: 30-40.

**Dostál, J. y Pavlok, P.** (1996). Isolation and characterization of maturation inhibiting compound in bovine follicular fluid. *Reprod. Nutr. Dev.* 36: 681-690.

**Edwards, R.G.** (1974). Follicular Fluid. *J. Reprod. Fert.* 37: 189-219.

**Eppig, J.J.** (1993). Regulation of mammalian oocyte maturation. In : *The Ovary*, ed. Adashi, E.Y. and Leung K.P. Raven Press. New York E.U.A. pp. 185-208.

**Eppig, J.J., Schultz, R.M., O'Brien, M. y Chesnel, F.** (1994). Relationship between the development programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.* 164: 1-9.

**Eppig, J.J., O'Brien, M. y Wigglesworth K.** (1996). Mammalian oocyte growth and development in vitro. *Mol. Rep. Dev.* 44: 260-273.

**Eppig, J.J.** (1996). Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 8: 485-9.

**Fissore, R.A., He, C.L. y Vande Woude, G.F.** (1996). Potential role of Mitogen-Activated Protein Kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biol. of Reprod.* 55: 1261-1270.

**Freeman, M.R., Withworth, C.M. y Hill, G.A.** (1995). Granulosa cell co-culture enhances human embryo development and pregnancy rate following in vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 10: 408-414.

**Funahashi, H. y Day, B.N.** (1993a). Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 98: 179-185.

**Funahashi, H. y Day, B.N.** (1993b). Effects of different serum supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Theriogenology* 39: 965-973.

**Funahashi, H. y Day, B.N.** (1995). Effects of cumulus cells on glutathione content of porcine oocyte during in vitro maturation. *J. Anim. Sci.* 73(suppl. 1): 90.

**Funahashi, H., Stumpf, T.T., Kim, N. y Day, B.N.** (1996). Low salt maturation medium enhances the histone h1 kinase activity of porcine oocytes at the end of in vitro maturation. *J. Reprod. Dev.* 42: 109-115.

**Gall, L., De Smedt, V., Crozet, N., Ruffini, S. y Sévellec, C.** (1996). Meiotically incompetent and competent goat oocytes : timing of nuclear events and protein phosphorylation. *Theriogenology* 46: 825-835.

**Gérard, N., Duchamp, G., Goudet, G., Bézard, J., Magistrini, M. y Palmer, E.** (1998). A high-molecular-weight preovulatory stage-related protein in equine follicular fluid and granulosa cells. *Biol. of Reprod.* 58: 551-557.

**Gómez, E., Tarín, J.J. y Pellicer A.** (1993). Oocyte maturation in humans : the role of gonadotropins and growth factors. *Fertil. Steril.* 60: 40-46.

**González, M.H.** (1997). Réponse au stress acide chez *Streptococcus thermophilus*. Purification, identification et caractérisation d'une protéine surexprimée. *Tesis Doctoral. Laboratoire des Biosciences de l'Aliment, Faculté des Sciences, Université Henri Poincaré, Nancy, Francia.*

**Gosden, R., Krapez, J. y Briggs, D.** (1997). Growth and development of the mammalian oocyte. *BioEssays* 19: 875-882.

**Gruppen, C.G., Nagashima, H. y Nottle M.B.** (1995). Cysteamine enhances in vitro development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Biol. of Reprod.* 53: 173-178.

**Hinrichs, K., Martin, m.G., Schmidt, A.L. y Friedman, P.P.** (1995). Effect of follicular components on meiotic arrest and resumption in horse oocytes. *J. Reprod. Fert.* 104: 149-156.

- Homa, S.T., Carroll, J. y Swann.** (1993). The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Hum. Reprod.* 8: 1274-1281.
- Howlett, S.K.** (1986). A set of proteins showing cell cycle-dependent modification in the early mouse embryo. *Cell* 45: 387-96.
- Iritani, A., Niwa, K. y Imai, H.** (1978). Sperm penetration in vitro of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.* 54: 379-383.
- Izadyar, F., Hage, W.J., Colenbrander, B. y Bevers, M.M.** (1998). The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. *Mol. Rep. Dev.* 49: 444-453.
- Jones, R.** (1991). Interaction of zona pellucida glycoproteins, sulphated carbohydrates and synthetic polymers with proacrosin, the putative egg-binding protein from mammalian spermatozoa. *Development* 111: 1155-1163.
- Ka, H., Sawai, K., Wang, W., Im, K. y Niwa, K.** (1997). Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated in vitro. *Biol. of Reprod.* 57: 1478-1483.
- Kawano, Y., Narahara, H., Matsui, N., Nasu, K., Miyamura, K. y 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. y Mermillod, P.** (1997). Characterization of calf follicular fluid and its ability to support cytoplasmic maturation of cow and calf oocytes. *J. Reprod. Fert.* 111: 267-275.
- Kikuchi, K., Nagai, T., Motlík, J., Shioya, Y. y Izaike, Y.** (1993). Effect of follicle cells on in vitro fertilization of pig follicular oocytes. *Theriogenology* 39: 593-599.
- Kikuchi, K., Naito, K., Daen, F.P., Izaike, Y. y Toyoda, Y.** (1995). Histone h1 kinase activity during in vitro fertilization of pig follicular oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 43: 523-532.
- Kobayashi, K., Yamashita, S. y Hoshi, H.** (1994). Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  on in vitro maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. *J. Reprod. Fert* 100: 439-446.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Leman, A.D. y Dziuk, P.J.** (1971). Fertilization and development of pig follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.* 26: 387-389.

**Lévesque, J.T. y Sirard, M.** (1995). Effects of different kinases and phosphatases on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 42: 114-121.

**Lipford S.S., Pomerantz, S.H., Schwartz-Kripner, A. y Channing, C.P.** (1978). Inhibitor of oocyte maturation from porcine follicular fluid : Further purification and evidence for reversible action. *Biol. Reprod.* 19: 585-592.

**Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M.P. y Gordon, I.** (1994). Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 37: 48-53.

**Lonergan, P., Carolan, C., Van Langendonck, A., Donnay, I., Khatir, H. y Mermillod, P.** (1996). Role of Epidermal Growth Factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol. Reprod.* 54: 1420-1429.

**Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J.** (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

**Macháty, Z., Funahashi, H., Day, B.N. y Prather, S.R.** (1997). Developmental changes in the intracellular  $Ca^{2+}$  release mechanisms in porcine oocytes. *Biol. of Reprod.* 56: 921-930.

**Maleszewski, M.** (1995). Sperm nuclei entering parthenogenetically activated mouse oocytes before the first mitosis transform into pronuclei. An ultrastructural study. *The Anatomical Record.* 243: 516-518.

**Mattioli, M., Galeati, G., y Seren, E.** (1988). Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronuclear formation. *Gamete Res.* 20: 177-183.

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

**McGaughey, R.W.** (1978). In vitro oocyte maturation. In : *Methods in Mammalian Reproduction.* ed. Daniel, J.C. Acad. Press. New York, E.U.A. pp. 1-19.

**Mo, H., Yan, T.Y. y Shen, Z.W.** (1991). Isolation, characterization, and localization of the zona pellucida binding proteins of boar sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 28: 124-130.

**Montag, M., Tok, V., Liow, S., Bongso, A. y NG S.** (1992). In vitro decondensation of mammalian sperm and subsequent formation of pronuclei-like structures for micromanipulation. *Mol. Reprod. Dev.* 33: 338-346.

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

- Motlík, J., Crozet, N., y Fulka, J.** (1984). Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fert.* 72: 323-328.
- Motlík, J. y Fulka, J.** (1986). Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology* 25: 87-96.
- Motlík, J., Fulka, J. y Fléchon, E.** (1986). Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fert.* 76: 31-37.
- Motlík, J., Pavlok, A., Kubelka, M., Kalous, J. y Kalab, P.** (1998). Interplay between cdc2 kinase and map kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology* 49: 461-469.
- Moor, R.M. y Trounson, A.O.** (1977). Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *J. Reprod. Fert.* 49: 101-109.
- Nagai, T., Niwa, K. y 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., Takahashi, T., Masuda, H., Shioya, Y., Kuwayama, M., Fukushima, M., Iwasaki, S. y Hanada, A.** (1988). In vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 84: 585-591.
- Nagai, T.** (1994). Current status and perspectives in IVM-IVF of porcine oocytes. *Theriogenology* 41: 73-78.
- Naito, K., Fukuda, Y. y Toyoda, Y.** (1988). Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro. *Gamete Res.* 21: 289-295.
- Naito, K., Fukuda, Y. y Ishibashi, I.** (1989). Developmental ability of porcine ova matured in porcine follicular fluid in vitro and fertilized in vitro. *Theriogenology* 31: 1049-1057.
- Naito, K., Kosaka, M., Fukuda, Y. and Ishibashi, I. y 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(4): 213-218.
- Naito, K., Daen, F.P. y Toyoda, Y.** (1992). Comparison of histone h1 kinase activity during meiotic maturation between two types of porcine oocytes matured in different media in vitro. *Biol. of Reprod.* 47: 43-47.

- Naito, K., Hawkins, C., Yamashita, M., Nagahama, Y., Aoki, F., Kohmoto, K., Toyoda, Y. y Moor, R.M.** (1995). Association of p34<sup>cdc2</sup> and cyclin B1 during meiotic maturation in porcine oocytes. *Dev. Biol.* 168: 627-634.
- Nakayama, T., Inoue, M. y Sato, E.** (1996). Effect of oocyectomy on glycosaminoglycan composition during cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro. *Biol. of Reprod.* 55: 1299-1304.
- Nandedkar, T.D., Parkar, S.G., Iyer, K.S., Mahale, S.D., Moodbidri, S.B., Mukhopadhyaya, R.R. y Joshi, D.S.** (1996). Regulation of follicular maturation by human ovarian follicular fluid peptide. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 50: 95-104.
- Ocaña-Quero, J.M., Moreno Millán, M., Valera Córdoba, M. y Rodero Franganillo, A.** (1994). The influence of different types of media supplement on the meiotic maturation of bovine oocytes in vitro. *Theriogenology* 41: 405-411.
- Oakley, B.R., Kirsch, D.R. y Morris, N.R.** (1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.* 105: 361-363.
- Parry, R.V., Barker, P.J. y Jones, R.** (1992). Characterization of low Mr zona pellucida binding proteins from boar spermatozoa and seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 33: 108-115.
- Perreault, S.D., Naish, S.J. y Zirkin, B.R.** (1987). The timing of hamster sperm nuclear decondensation and male pronucleus formation is related to sperm nuclear disulfide bond content. *Biol. of Reprod.* 36: 239-244.
- Perreault, S.D., Barbee, R.R. y Slott, V.L.** (1988). Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev. Biol.* 125: 181-186.
- Peter, M., Nakagawa, J., Dorée, M., Labbé, J.C. y Nigg, E.A.** (1990). In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 61: 591-602.
- Racowsky, C. y McGaughey, R. W.** (1982). Further studies of the effects of follicular fluid and membrana granulosa cells on the spontaneous maturation of pig oocytes. *J. Reprod. Fert.* 66: 505-512.
- Reyes, R., Carranco, A., Hernández, O., Rosado, A., Merchant, H. y Delgado, N.H.** (1984). Glycosaminoglycan sulfate as acrosome reaction-inducing factor of follicular fluid. *Arch. Androl.* 12: 203-209.
- Reyes, R., Rosado, A., Hernández, O. y Delgado, N.M.** (1989). Heparin and Glutathione : Physiological decondensing agents of human sperm nuclei. *Gamete Res.* 23: 39-47.

**Reyes, R., Delgado, N.M., Huacuja, L., Carranco, A. y Rosado, A.** (1990). Maduración folicular en el cerdo. Cambios en el patrón de secreción de proteínas durante el crecimiento folicular. *Arch. Invest. Méd.(Mex.)* 21: 375-379.

**Rodman, T.C., Pruslin, F.H., Hoffman, P.H. y Allfrey, V.C.** (1981). Turnover of basic chromosomal proteins in fertilized eggs : A cytoimmunochemical study of events in vivo. *J. of Cell Biol.* 90: 351-361.

**Rodman, T.C., Pruslin, F.H. y Allfrey, V.C.** (1984). Protamine-DNA association in mammalian spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 150: 269-281.

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

**Romero-Arredondo, A. y Seidel, Jr. G.E.** (1996). Effects of follicular fluid during in vitro maturation of bovine oocytes on in vitro fertilization and early embryonic development. *Biol. of Reprod.* 55: 1012-1016.

**Rosales, A.M. y Rosado, A.** (1989). Bioquímica de la maduración folicular en el mamífero. *Ciencia* 40: 275-288.

**Salustri, A., Hascall, V.C., Camaioni, A. y Yanagishita, M.** (1993). Oocyte-Granulosa cell interactions. In : *The Ovary.* ed. Adashi, E.Y. and Leung K.P. Raven Press. New York, E.U.A. pp. 209-225.

**Silva, C.C. y Knight, P.G.** (1998). Modulatory actions of Activin-A and Follistatin on the developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes.

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

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

**Sun, F.J., Holm, P., Irvine, B. y Seamark, R.F.** (1994). Effect of sheep and human follicular fluid on the maturation of sheep oocytes in vitro. *Theriogenology* 41: 981-988.

**Sutovsky, P. y Schatten, G.** (1997). Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization. *Biol. of Reprod.* 56: 1503-1512.

**Szöllösi, D., Szöllösi, M.S., Czolowska, R. y Tarkowski, A.K.** (1990). Sperm penetration into immature mouse oocytes and nuclear changes during maturation: an EM study. *Biol. of Cell* 69(1-3): 53-64.

- Tsafiriri, A. y Channing, C.P.** (1975). An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis in vitro. *Endocrinology* 96: 922-927.
- Thibault, C., Szöllösi, D. y Gérard, M.** (1987). Mammalian oocyte maturation. *Reprod. Nutr. Develop.* 27: 865-896.
- Vitullo, A.D. y Ozil, J.P.** (1992). Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. *Dev. Biol.* 151: 128-136.
- Wang, W.H., Niwa, K. y Okuda, K.** (1991). In-vitro penetration of pig oocytes matured in culture by frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 93: 491-496.
- Wu, B., Ignatz, G.G., Currie, W.B. y Yang, X.** (1996). Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and cumulus cells during maturation in vitro of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 45: 560-565.
- Winston, N.J.** (1997). Stability of cyclin B protein during meiotic maturation and first mitotic cell division in mouse oocytes. *Biol. of Cell* 89: 211-219.
- Yoshida, M., Bamba, K. y Kojima, Y.** (1989). Effects of gonadotropins and estradiol-17 $\beta$  on the timing of nuclear maturation and cumulus mass expansion in pig oocytes cultured in vitro. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 35: 86-91.
- Yoshida, M., Ishizaki, Y. y Kawagishi, H.** (1990). Blastocyst formation by pig embryos resulting from in-vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Fert.* 88: 1-8.
- Yoshida, M., Ishigaki, K. y Pursel, V.G.** (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. y Kojima, Y.** (1992b). Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes in vitro and on their subsequent fertilizing and developmental capacity in vitro. *J. Reprod. Fert.* 95: 481-488.
- Yoshida, M.** (1993). Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 35: 76-81.
- Yoshida, M., Ishigaki, K., Nagai, T., Chikyu, M. y Pursel, V.G.** (1993a). Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: Relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol. of Reprod.* 49: 89-94.
- Yoshida, M., Mizoguchi, Y., Ishigaki, K., Kojima, Y. y Nagai, T.** (1993b). Birth of piglets derived from in vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 39: 1303-1311.