



IPICYT
INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.

POSGRADO EN BIOLOGIA MOLECULAR

“Fertilización in vitro en cerdos”

Tesis que presenta
Miguel Ángel Muñoz Valdez

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

En la especialidad de
Biología Molecular

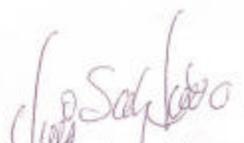
Director de la Tesis:
Dr. Rubén López Revilla



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "Fertilización in vitro en cerdos" presentada para obtener el Grado de de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por Miguel Ángel Muñoz Valdez y aprobada el 13 de diciembre de 2005 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.


Dr. Rubén López Revilla
(Director de la tesis)


Dr. Luis Salazar Olivo
(Asesor de la tesis)


Dr. Carlos Barajas López
(Asesor de la tesis)

Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Rubén López Revilla.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 185810 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

COPIA CERTIFICADA

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 016 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 15 días del mes de diciembre del año 2005, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

| | | |
|---|-------------------|---------------|
| Dr. Carlos Barajas López | Presidente | IPICYT |
| Dr. Luis Antonio Salazar Olivo | Secretario | IPICYT |
| Dr. Rubén Hipólito López Revilla | Sinodal | IPICYT |

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Miguel Angel Muñoz Valdez

sobre la Tesis intitulada:

Fertilización in vitro en cerdos

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Rubén Hipólito López Revilla

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 11:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 15 días del mes diciembre de 2005.


Dr. Marcial Borja Martínez
Secretario Académico


Mtra. Ma. Elisa Lucio Aguilar
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



DEDICATORIAS

El presente trabajo, en primer lugar va dedicado a las personas sin las cuales yo estaría perdido en muchas ideas y pensamientos. Dios, Xto y la virgen María.

A mi papá y mi mamá, las manos que aun toman las mías y me guían, los brazos que me protegen y me levantan, los hombros donde lloro y las espaldas donde me apoyo. Gracias por todo.

A Paulina (la Pawis), diferentes tú y yo como agua y aceite por afuera, pero el mismo corazón de pollo por dentro

A Jesús Manuel (Quecho), ¿la vida es un sueño imposible? gracias por demostrarme lo contrario (JAJAJA)

A Naty (la vaca), piedra angular de nuestra casa y nuestro corazón

A mis Abuelos, en especial a José Muñoz (PP) por haberme enseñado el amor a los animales y la pasión de trabajar para ellos.

A mis demás familiares que de alguna u otra forma me han apoyado

A mis buenos amigos que pertenecen a la banca. En especial a Carmen; gracias por tu tiempo, por tu paciencia, por tu apoyo, por ser mi amiga, muchos de mis logros te los debo

A mis compañeritas del IPICYT; inocentes, risueñas, tiernas, enojadas, enamoradas, confundidas, chocadas, embarazadas, traumadas, divertidas, perversas, alocadas, despistadas y todo lo demás.

AGRADECIMIENTOS

Sinceramente quiero agradecer al Dr. Rubén López Revilla, por ser mi asesor, creer en el proyecto, responder mis preguntas y guiarme durante el tiempo que duro el programa de maestría. Además agradecerle el que me haya vuelto a presentar a seis honrados servidores

Un agradecimiento especial para la Ing. Cytllalic Rangel por su ayuda, asistencia y respuestas a infinidad de preguntas referentes a la reproducción animal y de otros temas

A mis compañeritos de maestría por haber hecho mi estancia en el instituto algo excepcional, en especial a mis compañeras y amigas:

Astrid, cada vez que los cactus me espinaron, me ayudaste contra ellos

Jacqueline, tu sonrisa franca me enseñó lo que es una verdadera amiga

Nahomy, me pones de pie cuando mis alas desaparecen

Gracias

A los compañeros, técnicos y demás personal del laboratorio de “Biotecnología Médica y Pecuaria” por su apoyo y ayuda brindado durante la realización del presente trabajo

A las personas del rastro, que de una u otra manera me ayudaron en la obtención de los ovarios, en especial al Sr. Mario Alfonso Muñoz Pérez (¡Gracias Padrino!)

Al IPICYT por haberme aceptado en su programa de maestría en biología molecular

Al CONACYT por la beca que me otorgó

Contenido

| | |
|---|------|
| Constancia de aprobación de la tesis | ii |
| Créditos institucionales | iii |
| Acta de examen | iv |
| Dedicatorias | v |
| Agradecimientos | vi |
| Lista de tablas | viii |
| Lista de figuras | ix |
| Resumen | x |
| Abstract | xi |
| | |
| Introducción | 1 |
| Maduración in vitro de los complejos cúmulo-ovocito (CCO) | 1 |
| Capacitación espermática | 3 |
| Fertilización in vitro | 4 |
| Establecimiento de la FIV en el laboratorio | 5 |
| Materiales y métodos | 7 |
| Medios empleados | 7 |
| Recuperación y cultivo de complejos de cúmulo-ovocito | 7 |
| Fertilización in vitro | 8 |
| Resultados | 9 |
| Técnicas de extracción de los complejo cúmulo-ovocito | 9 |
| Maduración in vitro de los complejos cúmulo-ovocito | 10 |
| Capacitación espermática | 12 |
| Fertilización in vitro | 12 |
| Discusión | 13 |
| Referencias | 16 |
| Tablas | 20 |
| Figuras | 23 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| 1. Calidad de los complejos cúmulo-ovocito con los tres métodos empleados | 20 |
| 2. Cambios en los tipos de complejos cúmulo-ovocito durante la incubación en medio de maduración | 21 |
| 3. Complejos cúmulo-ovocito aptos para fertilización in vitro | 22 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| 1. Ovario porcino | 23 |
| 2. Recuperación de CCO bajo el microscopio de disección | 24 |
| 3. Tipos, aspecto microscópico y potencial de maduración in Vitro de los complejos cúmulo-ovocito (CCO) | 25 |
| 4. Calidad de los complejos cúmulo-ovocito (CCO) obtenidos con los tres métodos empleados | 26 |
| 5. Ejemplos de maduración de CCO de los tipos 4 y 5 durante la incubación en medio de maduración | 27 |
| 6. Ejemplos de la maduración de CCO tipo 3 durante la incubación en medio de maduración | 28 |
| 7. Ejemplos de degradación de CCO tipos 2 y 3 durante la incubación por 48 h en medio de maduración | 29 |
| 8. Maduración grupal de CCO tipo 3 a tipo 5 y degradación de un CCO tipo 3 a 2 | 30 |
| 9. Cinética de los cambios de CCO tipo 5 durante su incubación en medio de maduración por 24 y 48 h | 31 |
| 10. Cinética de los cambios de CCO tipo 4 durante su incubación en medio de maduración por 0, 24 y 48 h | 32 |
| 11. Cinética de los cambios de CCO tipo 3 durante su incubación en medio de maduración por 24 y 48 h | 33 |
| 12. Aspecto microscópico de los espermatozoides de cerdo antes y después de la capacitación | 34 |
| 13. Fertilización de ovocitos de cerdo con espermatozoides de cerdo capacitados | 35 |

RESUMEN

La fertilización in vitro (FIV), empleada con éxito a partir de 1980 para generar embriones humanos y de otras especies animales, se basa en el cocultivo de gametos femeninos madurados in vitro con espermatozoides capacitados. Tres problemas fundamentales de la reproducción asistida del cerdo son la maduración de los ovocitos, la capacitación espermática y la polispermia. Para poder abordarlos en el futuro implementamos un método apropiado para la FIV del cerdo en cuatro etapas: obtención de complejos cúmulo-ovocito (CCO), maduración in vitro (MIV) de CCO, capacitación de espermatozoides y cocultivo de gametos.

Obtención de CCO. En cada experimento fueron empleados 10 ovarios de hembras de talla comercial, transportados del rastro al laboratorio en solución salina amortiguada con fosfatos a 4°C con penicilina, estreptomina y anfotericina. Los CCO fueron aislados a partir de folículos de 0.3-6 mm de diámetro mediante corte con bisturí; la tasa de extracción fue ~1.5 CCO/min y la liberación fue lograda agitando el ovario sumergido en medio de Dulbecco con antibióticos. Los CCO liberados fueron aspirados con micropipeta bajo el estereomicroscopio y clasificados por su aspecto: tipo 1, CCO degradados; tipo 2, sin células del cúmulo; tipos 3 y 4 con células del cúmulo disminuidas en número; tipo 5, con el máximo número de células del cúmulo compactas y uniformes. Para la MIV los tipos 3, 4 y 5, con potencial para madurar, representaron el 88% de los CCO aislados.

MIV. Grupos de 30-40 CCO de los tipos 3-5 fueron incubados a 38.5°C durante dos periodos sucesivos de 22 h en atmósfera húmeda con CO₂ al 5%; el primer periodo en medio 199 con hormona luteinizante y folículoestimulante y el segundo en el mismo medio sin hormonas. Los cambios microscópicos indicativos de maduración de los CCO aptos para FIV fueron: 1) aspecto viable (tipo 3-5), 2) células del cúmulo aumentadas en número y tamaño y 3) aparición de zona pelúcida. El 77% de los CCO maduraron in vitro con predominio del tipo 5 (37%), seguido de los tipos 3 (21%) y 4 (19%).

Capacitación. Los espermatozoides porcinos (adquiridos de Pig improvement, lote No. 337) a una concentración de 3×10^6 /ml fueron diluidos en medio de Dulbecco a 15×10^5 /ml e incubados 1.5 h a 37°C en atmósfera húmeda con CO₂ al 5% para volverlos hipermotiles (indicador principal de la capacitación).

Cocultivo. El cocultivo de 30-35 CCO maduros con 75 µl espermatozoides capacitados (1 CCO/3,500 espermatozoides) fue llevado a cabo mediante incubación por 6 h a 38.5°C en 100 µl de medio 199 en atmósfera húmeda con CO₂ al 5%. El éxito de la FIV y por tanto de los procesos previos de MIV y capacitación fue sugerido por la penetración de espermatozoides al óvulo. Con este método podremos abordar los problemas mencionados antes de la FIV de cerdos.

Palabras Clave: Cerdo, Fertilización in vitro, Maduración de ovocitos, Capacitación espermática, Cocultivo de gametos.

ABSTRACT

In vitro fertilization (IVF), successfully used since 1980 to generate human and other animal embryos, is based in the in vitro coculture of mature female gametes with capacitated spermatozoa. Three major problems of assisted pig reproduction are oocyte maturation, sperm capacitation and polyspermy. In order to approach them in the future we implemented an appropriate pig IVF method in four stages: obtention of cummulus-oocyte complexes (COC's), in vitro maturation (IVM) of COC's, sperm capacitation, and gamete coculture. **Obtention of COC's.** In each experiment 10 ovaries from commercial-size females were used, transported from the slaughterhouse to the laboratory in phosphate-buffered saline containing penicillin, streptomycin and amphotericin at 4°C. COC's were isolated by scalpel section of 0.3-6 mm-diameter follicles; the rate of extraction was ~1.5 CCO/min and release was attained by shaking the ovary in Dulbecco's culture medium. Released COC's were aspirated with a micropipette under a stereomicroscope and classified by their aspect: type 1, degraded COC's; type 2, without cummulus cells; types 3 and 4 with cummulus cells decreased in number; type 5, with the maximum number of compact and uniform cummulus cells. For IVM, types 3, 4 and 5, with potential to mature, represented 88% of the isolated COC's. **IVM.** Groups of 30-40 type 3-5 CCO's were incubated at 38.5°C for two successive periods of 22 h in a humid atmosphere with 5% CO₂; the first period in medium 199 with luteinizing and follicle-stimulating hormones and the second one in the same medium devoid of hormones. The microscopic changes indicating that matured CCO had become apt for IVF were: 1) viable aspect (type 3-5), 2) cummulus cells increased in number and size and 3) a distinctive pellucid zone. Seventy-seven percent of COC's matured in vitro with predominance of the type 5 (37%), followed by types 3 (21%) and 4 (19%). **Capacitation.** Pig spermatozoa (purchased from Pig improvement, lot No. 337) at a concentration of 3×10^6 /ml were diluted in Dulbecco's medium at 15×10^5 /ml and incubated for 1.5 h to 37°C in humid atmosphere with 5% CO₂ to make them hypermotile (major indicator of capacitation). **Coculture.** Coculture of 30-40 mature CCO's with capacitated spermatozoa (1 CCO/3,500 spermatozoa) was carried out by incubating them for 6 h at 38.5°C in 100 µl of medium 199 in a humid atmosphere with 5% CO₂. Success of the IVF technique and therefore of the previous IVM and capacitation processes was suggested by the penetration of spermatozoa to oocytes. With this method we expect to approach the pig IVF problems mentioned above.

Key words: Pig, In vitro fertilization, Oocyte maturation, Sperm capacitation, Gamete coculture.

INTRODUCCIÓN

La fertilización in vitro (FIV) es una técnica para la reproducción asistida de mamíferos basada en el cocultivo de espermatozoides y óvulos en condiciones controladas para generar huevos que inicien el desarrollo embrionario con fines de reproducción, investigación y producción de animales seleccionados.

La FIV ha sido aplicada satisfactoriamente en humanos (Steptoe y Edwards 1978) así como en otras especies de mamíferos de interés económico o social (Bavister 2002) desde fines de la década de 1970. El interés económico que representa la producción de cerdos ha atraído la atención para el desarrollo de técnicas eficientes de FIV en esta especie animal, además, tiene características ventajosas para ser usada en biomedicina.

El uso de embriones porcinos para la investigación ha aumentado drásticamente debido a que la generación de cerdos transgénicos, el mejoramiento genético y la recuperación de cerdos con características especiales requieren una fuente confiable de embriones desarrollados correctamente.

Los embriones más seguros de obtener son los generados in vivo, pero requieren personal altamente calificado y resultan muy caros. Una alternativa viable parece ser la generación de embriones in vitro que sería más barata pero no está exenta de problemas o errores. Aunque Cheng (1985) demostró que pueden producirse cerdos vivos mediante FIV, los avances en esta área han sido escasos debido principalmente a las dificultades en la maduración de los ovocitos, la técnica de la FIV propiamente dicha y el cultivo de embriones (Coy et al. 2002).

Maduración in vitro de los complejos cúmulo-ovocito (CCO)

Igual que los ovocitos humanos, los ovocitos porcinos inician in vivo la meiosis durante el estadio fetal y se detienen en profase I inmediatamente después del nacimiento. Hasta que se inician los cambios hormonales de la pubertad los ovocitos reinician la división y comienzan a madurar hasta metafase II, momento de la ovulación. Cada ovocito se encuentra en el ovario dentro de un folículo

cubierto por varias capas de células de la teca separadas de la granulosa por una membrana vascularizada (Hafez et al. 2000). Dentro del folículo el ovocito se encuentra en la zona denominada antro, llena de fluido y rodeada por la capa granulosa. El ovocito está además envuelto por varias capas compactas de células del cúmulo, por lo cual más que ovocito se denomina como complejo cúmulo-ovocito (CCO), el cual está sujeto a la granulosa por un tallo de células de cúmulo.

Durante los cambios relacionados con la pubertad y la vida reproductiva posterior del cerdo, oleadas de gonadotropinas favorecen el desarrollo de los folículos y la maduración de los CCO (Illera et al. 1998). Los cambios hormonales inician en la hipófisis con la producción de dos hormonas que reactivan la meiosis de los CCO y desencadenan la ovulación: la foliculotrófica (FSH) y la luteinizante (LH). La FSH hace que el folículo aumente paulatinamente de tamaño hasta que se tensa y al momento de la ovulación se rompe por efecto de la alta concentración de LH.

La FIV permite reproducir los eventos que llevan a la ovulación in vivo. Diversos estudios han permitido establecer condiciones apropiadas para la maduración in vitro (MIV) de los CCO (Pavlok 1981, Cheng et al. 1985, Yoshida 1987). La mayoría proponen que la maduración citoplásmica y nuclear y el desarrollo subsiguiente que permite la fertilización de los ovocitos son afectados por el fluido folicular porcino (FFP) así como por el tamaño del folículo del que proviene el CCO (Vatzias et al. 1999).

El rastro local es una fuente constante de CCO para MIV (Coy y Romar 2002). Al igual que en otras especies, los ovocitos inmaduros de cerdas de talle comercial sacrificadas pueden reasumir la meiosis y completar la maduración in vitro. Por ser las cerdas poliéstricas, de un solo ovario pueden obtenerse varios CCO adecuados para la maduración in vitro.

No todos los CCO son aptos para la MIV ya que su calidad depende del tamaño del folículo. Esta idea fue propuesta por Motlik et al. (1984) quienes encontraron que folículos menores de 0.7 mm de diámetro son incapaces de reasumir la meiosis y los mayores de 3 mm no permiten el desarrollo embrionario. Posteriormente Coy y Romar (2002) redefinieron el rango hasta folículos de 6 mm

de diámetro. Es por lo tanto necesario seleccionar y emplear folículos de 0.7-6 mm para obtener los CCO adecuados para la MIV.

Desde que Cheng (1985) obtuvo los primeros cerdos vivos por fertilización in vitro se han usado diversos medios de maduración (Mattioli et al. 1989, Yoshida et al. 1992, Funahashi et al. 1994), siendo el más común el medio 199 suplementado con gonadotropinas y FFP. La FSH induce expansión del CCO y maduración nuclear in vitro (Singh et al. 1993 y 1993). Mattioli et al. (1991) demostraron que la mezcla de FSH y LH acelera y facilita la progresión mitótica del ovocito. Por otro lado el FFP, de composición no definida claramente, favorece la maduración (Yoshida et al. 1992).

Capacitación espermática

La capacitación de los espermatozoides fue descrita por Austin (1951) y Chang (1951) al inicio de la era de la reproducción asistida en animales domésticos. El proceso de capacitación in vivo implica que los espermatozoides desestabiliza su membrana por las condiciones prevalentes en el tracto genital femenino, especialmente en la zona del istmo (Hunter y Nichol 1988). Los cambios metabólicos, de motilidad, concentración de iones y reorganización de la membrana preparan a los espermatozoides para la reacción acrosomal y les permiten adquirir la capacidad de penetrar el óvulo, indispensable para la fertilización (ver Töpfer-Peterson et al. 2000).

La FIV emula las condiciones que favorecen la capacitación para obtener espermatozoides hipermóviles en los cuales se inicia la reacción acrosomal. En la capacitación se han probado diferentes medios (i.e., DMEM, 199; Ringer-Tyrode) y también se ha usado el Percoll (Mattioli et al. 1989). Esta última técnica es muy usada por su rapidez y eficiencia para aislar espermatozoides móviles no contaminados por otros compuestos del semen (Ng et al. 1992).

Desde que Pavlok (1981) logró por primera vez la FIV en cerdos usando espermatozoides capacitados in vitro, la técnica se ha vuelto más rápida y sencilla (Coy y Romar 2002).

Fertilización in vitro

La fecundación en los mamíferos requiere que ocurran tres eventos críticos: 1) la migración de los espermatozoides entre las células del cúmulo (si las hay), 2) la fijación del espermatozoide y su migración a través de la zona pelúcida y 3) la fusión de las membranas plasmáticas del espermatozoide y el óvulo (Hafez et al. 2000).

La reacción acrosomal es un prerrequisito para la fusión entre las membranas plasmáticas de los gametos femenino y masculino (Yanagamachi et al. 1981). Las enzimas expuestas durante la reacción acrosomal son necesarias para el paso de los espermatozoides hiper móviles por la zona pelúcida.

Inmediatamente después de la fecundación la superficie ovular cambia para impedir la fusión de más espermatozoides. Cuando esto no ocurre se produce polispermia (i.e., la entrada de dos o más espermatozoides al óvulo) que en los cerdos genera embriones poliploides inviables (Hafez et al. 2000).

Desde la primera publicación sobre la producción de cerdos vivos mediante FIV (Cheng 1985) la técnica se ha repetido en numerosas ocasiones (Mattioli et al. 1989, Yoshida et al. 1993, Abeydeera y Day 1997, Rath et al. 1999), aunque en términos de eficiencia no ha avanzado suficientemente para ser aplicada de rutina. Cheng et al. (1986) establecieron que la polispermia es uno de los mayores problemas para la FIV exitosa, esto aún persiste.

Para poder realizar exitosamente la FIV en cerdos debe tomarse en cuenta el tiempo de incubación de los ovocitos con los espermatozoides capacitados, la concentración espermática y la composición del medio. Abeydeera y Day (1997) encontraron que el tiempo recomendable de coincubación es de 6 h (al cabo de las cuales hay 81% de penetración con 39% de polispermia). Rath (1992) y Abeydeera y Day (1997) encontraron una correlación directa entre la concentración de los espermatozoides empleados y el grado de polispermia. La mayoría de los medios son adecuados y comúnmente se usa el medio 199 (Yoshida et al. 1987, Nagai y Moore 1990, Funahashi et al. 1994) aunque pueden emplearse otros como el Bracket-Oliphant (Wang et al. 1991; Kikuchi et al. 1999),

la solución de Krebs-Ringer (Naito et al. 1988) y la solución salina amortiguada con Tris (Abeydeera y Day 1997).

Establecimiento de la FIV en el laboratorio

En el presente trabajo nos propusimos establecer un protocolo de FIV para poder abordar en el futuro problemas como el cultivo y sexado de embriones así como la prevención de la polispermia.

El establecimiento del protocolo para la FIV que constituye el presente trabajo consistió en determinar las condiciones apropiadas en cuatro etapas sucesivas:

- 1) Obtención de los complejo cúmulo-ovocito (CCO)
- 2) Maduración in vitro de los complejos cúmulo-ovocito,
- 3) Capacitación de los espermatozoides y
- 4) Fertilización in vitro propiamente dicha.

Usualmente se emplean tres formas de extracción de CCO de los folículos: corte, aspiración y punción, cada una de las cuales tienen ventajas y desventajas (Abeydeera 2002, Coy y Romar 2002). El principal factor limitante para la obtención de los CCO es el tamaño de los folículos de los cuales se extraen (Motlik et al. 1984).

Los CCO recuperados de los folículos son clasificados en cinco tipos. Los tipos 1 y 2 se consideran inviables por lo cual se prefieren los tipos 3, 4 y 5 (cúmulos compactos con una o más capas) que luego son madurados in vitro en un medio adecuado tal como el medio 199 (Bjerregaard et al. 2004) suplementado con FSH, LH y FFP (Mattioli et al. 1991; Yoshida et al. 1992). La maduración in vitro se acompaña de expansión de las células del cúmulo y aparición de la zona pelúcida (Hafez et al. 2000, Abeydeera 2002, Coy et al. 2002).

Los espermatozoides pueden ser lavados e incubados en DMEM para eliminar los factores incapacitantes presentes en el plasma seminal con el objeto de capacitarlos, con lo cual se vuelven hiper móviles (Hafez et al. 2002).

Una vez que los CCO han madurado y los espermatozoides han sido capacitados in vitro, para la FIV propiamente dicha ambos gametos pueden cocultivarse en medio 199 (Coy y Romar. 2002) por unas 6 h (Abeydeera y Day 1997).

Mediante la prueba y adopción sistemática de las variables más convenientes en cada una de las cuatro etapas mencionadas aparentemente logramos establecer en nuestro laboratorio un protocolo para la FIV en cerdos que podrá servir para continuar trabajando en el sexado de embriones y la prevención de la polispermia.

Tanto el sexado de embriones como la polispermia se contemplaron dentro del trabajo en un principio, pero por efecto del tiempo y la duración de los experimentos de estandarización no fue posible iniciar esos temas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medios empleados

La colecta y lavado de los CCO fue realizada en medio de cultivo (MC) consistente en DMEM suplementado con 50 UI/ml de sulfato de estreptomicina y 50 UI/ml de penicilina G potásica. El medio de maduración (MM) era medio de cultivo 199 (TCM 199) (Bjerregaard et al. 2004) con estreptomicina y penicilina a las concentraciones indicadas, suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino, 10% (v/v) de fluido folicular porcino (FFP), NaHCO_3 al 0.75%, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 0.9 mM, 1 U/ml de hormona folículo-estimulante (FSH). El medio para la fertilización in vitro (MFIV) fue TCM 199 con estreptomicina y penicilina. Los medios de maduración y fertilización fueron incubados en atmósfera con 5% de CO_2 a 38.5°C al menos 12 h antes de usarlos. El FFP fue colectado de folículos de 0.7-6 mm de diámetro, centrifugado a 100xg por 10 min, esterilizado por filtración en membranas Millipore de nitrocelulosa con poros de 0.22 μm y mantenido a -20°C hasta su uso.

Recuperación y cultivo de complejos cúmulo-ovocito

Los ovarios (Fig. 1) de hembras de talla comercial prepúberes fueron obtenidos en el rastro de la ciudad de San Luis Potosí, fueron resacados con tijeras y depositados en bolsas de plástico estériles con cierre hermético. Fueron lavados dos veces con 250 ml de solución salina (NaCl al 0.9%, pH 7.4) y transportados al laboratorio en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS; PB 15mM, NaCl 0.15 M, pH 7.4) suplementada con sulfato de estreptomicina y penicilina G potásica, dentro de un recipiente con hielo. El tiempo transcurrido entre la muerte del animal y la colecta de los CCO nunca fue mayor de 4 h.

Los folículos son clasificados en tres tamaños (Coy y Romar 2002): pequeños (≥ 3 mm), medianos (3-6 mm) y grandes (≤ 6 mm). De los folículos de tamaño mediano en el laboratorio se recuperaron los CCO empleados en este trabajo mediante cortes superficiales con navaja No. 22 en un bisturí. Los CCO liberados eran colectados en MC y mantenidos en reposo en un vaso de

precipitados de 100 ml para que sedimentaran por 10 min; el medio de los dos tercios superiores fue descartado por aspiración y el medio remanente con los CCO sedimentados en el fondo era transferido a una caja de Petri estéril de 100 mm de diámetro. Los CCO eran recuperados con una micropipeta de 10 o 100 μ l (Fig. 2) y clasificados en cinco tipos (Fig. 3); los que tenían al menos una capa de células foliculares compacta (tipos viables 3, 4 o 5) fueron lavados con MM sin hormonas. Grupos de 30-40 CCO, seleccionados al azar, eran transferidos a viales de cultivo estériles de 2 mm que contenían 500 μ l de MM suplementado con hormonas. Después de 22 h de incubación a 38.5°C en atmósfera húmeda con CO₂ al 5%, los CCO fueron lavados con MM sin hormonas y resuspendidos en 500 μ l de MM sin hormonas por otras 22 h.

Fertilización in vitro

La FIV se empieza a preparar 2 h antes del término de la incubación para la MIV de los CCO. Tres ml de semen porcino comercial (Fig. 12) (Pig improvment, Animal No. 337,2005) son añadidos lentamente en un ángulo de 45° a 3 ml de MC (pH 7.2) precalentado a 37°C. La mezcla resultante de 6 ml es incubada 1.5 h a 37°C en atmósfera húmeda con CO₂ al 5% para obtener una concentración final de 15×10^5 espermatozoides/ml. Al término de la incubación es recuperado el ml superior, el cual contiene espermatozoides limpios, capacitados y con principios de reacción acrosomal.

Una vez que transcurren 44 h de incubación, y antes del cocultivo con espermatozoides, los CCO son lavados dos veces con MM sin hormonas y transferidos por 30 min a 100 μ l MFIV en grupos de 30–35. De la suspensión de espermatozoides se toman 75 μ l que se mezclan con los CCO en MFIV para obtener ~1 ovocito/3,500 espermatozoides. CCO y espermatozoides son luego coincubados a 38.5°C por 6 h en atmósfera húmeda con CO₂ al 5%.

RESULTADOS

Técnicas de extracción de los complejos cúmulo-ovocito

Las técnicas comunes para la extracción de complejos cúmulo-ovocito (CCO) de los folículos son tres: punción, corte y aspiración. Decidí probar las tres para determinar cuál se adapta mejor a las condiciones empleadas en este trabajo. Los parámetros para la elección de la mejor técnica fueron la calidad y la cantidad de los CCO obtenidos.

Corte

Con un bisturí con navaja 22 corté 183 folículos de tamaño medio. Una vez cortado cada folículo, introducía el ovario al medio de colecta (MC) y lo agitaba ligeramente para recuperar el contenido. Esta técnica me permitió obtener 112 CCO en 90 minutos, es decir, el 61.2% de los folículos cortados (Tabla 1). Casi el 100% de los CCO fueron aceptables, i.e., sin daños en el cúmulo (Fig. 4A).

Aspiración

Con la aguja de una jeringa insulínica penetré 185 folículos de tamaño medio. Una vez penetrado cada folículo, absorbía el contenido con la jeringa y lo depositaba en una caja de Petri estéril de 60 mm. Esta técnica me permitió obtener 28 CCO en 60 minutos, que representa el 15.1% de los folículos aspirados (Tabla 1). El 50% de los CCO obtenidos tuvo calidad aceptable (Fig. 4B).

Punción

Con la punta de una aguja hipodérmica calibre 0.80 mm estéril, perforé 214 folículos de tamaño medio. Una vez perforado cada folículo, introducía el ovario en MC y lo agitaba ligeramente para vaciar su contenido. De esta manera obtuve 12 CCO en 60 minutos, los cuales representan el 5.6% de los folículos perforados (Tabla 1). El 80% de los CCO obtenidos tuvo calidad aceptable (Fig. 4C).

Por los resultados mencionados concluí que el corte es la técnica más adecuada para la extracción de los CCO.

Maduración in vitro de los complejos cúmulo-ovocito

Aplicando la técnica de corte a 32 ovarios obtuve 201 CCO para maduración in vitro (MIV). Antes de iniciar el proceso clasifiqué los CCO en los tipos 1-5 (Fig. 3). Una vez clasificados, los CCO elegidos sumaban 141 (Tabla 2). Seguí el desarrollo individual de los CCO en los cuales determiné a las 0, 24, y 48 h de incubación 1) los cambios de un tipo a otro, 2) los cambios microscópicos de cada CCO y 3) la cinética de los cambios de los CCO inicialmente de tipo 3, 4 o 5. Con los resultados esperaba poder distinguir cuáles CCO tienen las características más apropiadas para la MIV y por lo tanto también para la fertilización in vitro (FIV).

Cambios de tipo

Comparé los cambios de tipo de los 141 CCO seleccionados a las 24 y 48 h de incubación. Al momento de aislar los CCO había 54 de tipo 5, 18 de tipo 4, 52 de tipo 3, 10 de tipo 2 y 7 de tipo 1 (Tabla 2). A las 24 h había 50 CCO de tipo 5, 33 de tipo 4, 36 de tipo 3, 12 de tipo 2 y 10 de tipo 1 (Tabla 2). A las 48 h había 51 CCO de tipo 5, 27 de tipo 4, 29 de tipo 3, 10 de tipo 2 y 22 de tipo 1 (Tabla 2).

Cambios microscópicos

Para decidir cuáles CCO serían adecuados para la FIV comparé los cambios microscópicos que sufrieron durante las 48 h de incubación. Basándome en las fotomicrografías que tomé a las 0, 24 y 48 h noté los cambios asociados a la maduración de los mismos CCO. Encontré tres tipos de cambios notorios: 1) aumento del tamaño y número de células del cúmulo, muy marcado (75%) en los CCO inicialmente de los tipos 5 y 4 (Fig.5), menor (50%) en los del tipo 3 (Fig. 6) y nulo en los del tipo 2 (Fig. 7 superior); 2) presencia de zona pelúcida a las 48 h en

CCO inicialmente de los tipos 3, 4 y 5 (Fig. 5 y Fig. 6); y 3) degradación de CCO independientemente de su tipo inicial (Fig. 7 inferior).

En un experimento de maduración grupal con seis CCO inicialmente de tipo 3 (Fig. 8) a las 48 h de incubación obtuve cinco CCO inicialmente de tipo 5 en los que aumentaron las células del cúmulo y la zona pelúcida y un CCO inicialmente de tipo 2 que se degradó.

Cinética de los CCO inicialmente de los tipos 3, 4 y 5

De los cinco tipos de CCO, los que merecen atención particular son los tipos 3, 4 y 5, aptos para la MIV. Estos tres tipos, además de tener un potencial medio/alto de maduración (Fig. 3), constituían más del 77% a las 48 h de incubación (Tabla 2).

Para determinar el desarrollo de cada uno de estos tipos de CCO durante la incubación, determiné las proporciones iniciales de los tipos 3, 4 y 5. Eran 124 (88%) del total de 141, repartidos así: 52 tipo 3, 18 tipo 4, 54 tipo 5 (Tabla 2).

Al cabo de 48 h, los 54 CCO iniciales tipo 5 se transformaron en dos de tipo 3, siete de tipo 4, 39 de tipo 5 y 6 se volvieron inviables (Fig. 9). Los 18 CCO inicialmente de tipo 4 se transformaron en cinco tipo 3, cuatro tipo 4, siete tipo 5 y dos inviables (Fig. 10). Los 52 CCO inicialmente de tipo 3 se transformaron en 27 de tipo 3, 14 de tipo 4, tres de tipo 5, y ocho inviables (Fig. 11).

Estos resultados indicaron que debería emplear CCO inicialmente de los tipos 3 a 5 en los experimentos subsecuentes de maduración.

Selección de CCO para FIV

Una vez conocidas la cinética de cambio de tipo y los cambios microscópicos durante la incubación por 48 h, pude seleccionar CCO aptos para la fertilización in vitro.

En el mismo experimento de MIV con 141 CCO iniciales, 108 resultaron aptos para FIV por poseer tres características básicas a las 48 h de maduración: 1) ser de los tipos 3-5 viables, 2) con aumento de células del cúmulo y 3) con zona pelúcida. Por dificultades en el manejo o contaminación con aceite mineral pude aislar 90 (83%) de este lote para intentar la FIV (Tabla 3).

Capacitación espermática

Una vez asegurada la MIV comencé a trabajar con los espermatozoides, para ser usados en la fertilización requieren ser capacitados.

Las características microscópicas de los espermatozoides con diluyente (“extensor de vida”) recién recibidos del proveedor eran: alta concentración ($3 \times 10^6/\text{ml}$) y escasa motilidad (Fig. 12A). Para capacitar a los espermatozoides los diluí 1:19 en DMEM y los incubé a 37.5°C en atmósfera con CO_2 al 5%. De esta manera obtuve espermatozoides a menor concentración ($15 \times 10^5/\text{ml}$) e hipermóviles a los 90 minutos de incubación (Fig. 12B); la motilidad fue el principal criterio de capacitación. Cuando la incubación en DMEM rebasó las 10 h los espermatozoides formaban agregados múltiples por adhesión de las cabezas (Fig. 12C), lo cual indicaba que eran inadecuados para la FIV.

Con la obtención de la hipermotilidad, decidí utilizar el DMEM como medio de capacitación, para así poder continuar al siguiente paso, la fertilización.

Fertilización in vitro

Una vez capacitados los espermatozoides, comencé a coincubarlos con CCO madurados in vitro.

Tan pronto como los espermatozoides capacitados detectaron la presencia de los CCO, comenzaron a rodear la células del cúmulo y por efecto de la hipermotilidad y capacitación lograron penetrarlo. Una vez dentro, varios espermatozoides con reacción acrosomal trataron de penetrar la zona pelúcida (Fig. 13A), esta fue solamente atravesada por uno (Fig. 13B). Este resultado sugiere que la FIV fue exitosa.

DISCUSIÓN

Como la FIV requiere complejos cúmulo-ovocito madurados in vitro de los tipos viables así como de espermatozoides capacitados, para poder implementarla tuvimos que establecer primero condiciones apropiadas para cada una de las etapas previas que sirven para la preparación de ambos gametos maduros.

Para iniciar el trabajo requeríamos saber cuál de las técnicas probadas (corte, aspiración, punción) era más adecuada para aislar los CCO de los folículos (Coy et al. 2002). El corte de los folículos da el máximo rendimiento (61%), claramente superior a la aspiración (16%) y a la punción (6%). Los CCO de máxima calidad son obtenidos mediante el corte ya que el 100% de los que son aislados de esta manera no tienen daños aparentes (i.e., desgarramiento del cúmulo, pérdida de ovocitos), en comparación con el 80% de la punción y el 50% de la aspiración. La velocidad relativa de extracción usando el corte de 1.5 CCO/min significativamente más rápida que la punción (0.2 CCO/min) y la aspiración (0.5 CCO/min). Estos resultados indican claramente que la técnica más conveniente para obtener CCO es el corte de los folículos. Estos resultados difieren notablemente del método de aspiración expuesto por Coy y Romar (2002) y Abeydeera (2002).

Una vez elegido el corte para la obtención de los CCO, determinamos las condiciones adecuadas para la MIV. De un total de 141 CCO elegidos al tiempo cero, 124 (90%) correspondieron a los tipos viables con alta probabilidad de maduración. La medición de la capacidad de maduración de los CCO depende del análisis de la cinética de los cambios microscópicos de los tipos de CCO iniciales durante su incubación para la maduración (Abeydera 2002, Coy et al. 2002). Por esta razón clasificamos los CCO viables al inicio, a la mitad y al final (0, 24 y 48 h) del tiempo de incubación para la MIV. El tipo 5 se mantiene como el más abundante a las 0, 24 y 48 h de incubación (38%, 36% y 37%); el tipo 4 aumenta inicialmente y tiene una ligera caída al final (13%, 23% y 19%), mientras que el tipo 3 disminuye progresivamente (37%, 26% y 21%). Al cabo de las 48 h de incubación para la MIV quedaron 108 CCO adecuados (77%) de los 124 CCO

inicialmente viables, con las tres características que los distinguen: 1) aspecto microscópico viable (tipos 3-5), 2) células del cúmulo aumentadas en número y volumen y 3) aparición de zona pelúcida. La ausencia de una de estas características indica que los CCO no son aptos para la FIV (Hafez et al. 2000, Abeydera 2002, Coy et al. 2002). Con estos resultados inferimos que no todos los CCO inicialmente viables maduran satisfactoriamente, que el 13% de los viables se vuelven inviables o se degradan y que los tipos inicialmente inviables se mantienen inviables o se degradan.

Al analizar la cinética de maduración de los 124 CCO inicialmente viables encontramos 54 de tipo 5, 18 de tipo 4 y 52 de tipo 3. Los CCO tipo 5 son los más estables (70%), seguidos por los del tipo 3 (36.5%) y tipo 4 (22%). Los CCO del tipo 4 son los que más cambian a otro tipo viable (50%), en contraste con los del tipo 3 (33%) y 5 (17%). Las proporciones de los tipos viables que se vuelven inviables (entre paréntesis) son similares: tipo 3 (15.3%), 5 (11.5%) y 4 (11%). Las proporciones de los CCO de cada tipo viable que maduran satisfactoriamente son: tipo 5 88.5%; tipo 3 84%; tipo 4 89%. El promedio de maduración de los tres tipos viables obtenido por nosotros (87%) es similar al de Coy et al. (1999). Por estos resultados concluimos que las condiciones de incubación determinadas por nosotros son adecuadas para la maduración in vitro de los CCO.

Como las condiciones de MIV fueron determinadas con CCO aislados, hicimos un experimento adicional para analizar la maduración de grupos de CCO, que de ser factible facilitaría el trabajo subsiguiente. Partiendo de seis CCO de tipo 3 obtuvimos un CCO inviable y cinco de tipo 5 entre los cuales aumentaron las células del cúmulo y apareció la zona pelúcida. Así se probó que también es posible madurar grupos de CCO.

Para la FIV con CCO madurados in vitro es necesario contar con espermatozoides capacitados, entre los cuales el indicador clave es la hipermotilidad (Hafez et al. 2000). Para promover la capacitación se incubaron los espermatozoides en DMEM a 37°C por 90 min al cabo de los cuales encontramos que los lentos movimientos iniciales de los espermatozoides cambiaron a una hipermotilidad notoria. Al incubar por más de 10 h los espermatozoides en las

condiciones de capacitación, éstos se adhirieron entre sí a través de las cabezas formando agregados ineficientes para la FIV. Hasta este punto habíamos encontrado las condiciones adecuadas para la capacitación de los espermatozoides, por lo cual a continuación decidimos intentar la FIV.

Los CCO maduros y los espermatozoides capacitados deben cocultivarse por 6 h para la FIV, que de ser exitosa confirma que los procesos de MIV y capacitación fueron adecuadas (Hafez et al. 2000, Abeydera 2002, Coy et al. 2002). El éxito de la FIV y por lo tanto de los procesos previos de la MIV de los CCO y de la capacitación espermática pareció comprobarse al obtener CCO con señales de penetración espermática (Fig. 13).

Con este trabajo hemos cumplido el objetivo de montar las condiciones para la obtención y maduración de los CCO así como la capacitación de los espermatozoides de cerdo para llevar a cabo la FIV en el laboratorio. Una vez dominada esta técnica podríamos obtener embriones cultivados in vitro para implementar técnicas adicionales tales como la transferencia y el sexado de embriones de interés comercial, así como hacer trabajo de investigación básica para analizar las causas de la polispermia y generar cerdos transgénicos (Abeydera 2002, Coy et al. 2002).

REFERENCIAS

- Austin CR. Observations on the penetrations of the sperm into the mammalian eggs. *Aus.J.Sci.Res.* 1951; 4: 581-96
- Abeydeera LR. In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology.* 2002; 57: 257- 273
- Abeydeera LR, Day BN. Fertilization and subsequent development in vitro of pig oocytes inseminated in a modified Tris-buffered medium with frozen – thawed ejaculated spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1997; 57: 729-34
- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Murphy CN, Prather RF, Day BN. Development and viability of pig oocytes matured in a protein free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology* 2000; 54: 787-797
- Abeydeera LR, Wang WH, Prather RF, Day BN. Maturation in vitro of pig oocytes in protein free culture medium: fertilization and subsequent embryo development in vitro. *Biol. Reprod.* 1998; 58:1316-1320
- Bavister BD. Early history of in vitro fertilization. *Reproduction.* 2002; 124: 181 -196
- Bjerregaard B, Wrenzycki C, Philimonenko VV, Hozak P, Laurincik J, Niemann H, Motlik J, Maddox-Hyttel P. Regulation of Ribosomal RNA synthesis during the final phase of porcine oocyte growth. *Biol. of Reprod.* 2003; 70: 925 - 935
- Chang MC, Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 1951; 168:697-8
- Cheng WTK, “In vitro fertilization of farm animal oocytes” 1985. Datos sin publicar , Tesis doctoral
- Cheng WTK, Moor RM, Polge C. In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro. *Theriogenology* 1986;25:146
- Coy P, Ruiz S, Romar R, Campos L, Gadea J. Maturation fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different systems. *Theriogenology* 1999;51:799-812
- Coy P, Romar R. In vitro production of pig embryos: a point of view. *Reprod. Fertil. Dev.* 2002;14:275-286
- Ding J, Foxcraft GR. Epidermal growth factor enhanced oocyte maturation . *Mol Reprod Dev* 1994;39:30-40

- Funahashi H, Day BN. Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* 1993;98:179-185
- Funahashi H, Cantley T.C. and Day BN. Different hormonal requirements of pig oocyte-cumulus complexes during in maturation in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 1994; 101, 159-65
- Hafez ESE, Hafez B. Reproducción e inseminación artificial. Mc Graw Hill. 2000; 7a edición
- Hunter RHF, Nichol R. Capacitation potential of the fallopian tube: a study involving surgical insemination and the subsequent incidence of polyspermy. *Gamete Res.* 1988; 21:255-66
- Illera MJ, Lorenzo PJ, Illera JC and Petters RM. Developmental competence of immature pig oocytes under the influence of EGF, IGF-1, follicular fluid and gonadotropins during IVM-IVF processes. *Int. J. Dev. Biol.* 1998; 42: 1169-72
- Iwakasi T, Kimura E, Totsukawa K. Studies on a chemically defined medium for in vitro culture of in vitro matured and fertilized porcine oocytes. *Theriogenology* 1999; 51:709-720
- Kikuchi K, Kashiwazaki N, Noguchi j, Shimada A, Takahashi R, Hirabayashi M, Shino M, Ueda M, Kaneko H. Developmental competence after transfer to recipients, of porcine oocytes matured, fertilized and cultured in vitro. *Biol Reprod* 1999; 60:336-340
- Levitranò M, Forni M, Varzi V, Pucci L, Bacci ML, Di Stefano C, Fioretti D, Zaraqì G, Moìoli B, Rossi M. Sperm-mediated gene transfer: production of pigs transgenic for human regulator of complement activation. *Transplant Proc* 1997; 29:3508-3509
- Mattioli M, Bacci M, Galeati G, Seren E. Development competence of pig oocytes matured and fertilization in vitro. *Theriogenology* 1989;31:1201-1207
- Mattioli M, Bacci ML, Galeati G, Seren E. Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocyte in vitro. *Theriogenology* 1991; 36: 95-105
- Moor RM, Mattioli M, Ding J, Nagai T. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil* 1990; 40:197-200
- Motlik J, Crozet N and Fulka J. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fertil.* 1984; 72: 323-328

- Naito K, Fukuda Y, Toyada Y. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro. *Gamete Res.* 1988; 21:289-95
- Nagai T, Moore RM. Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized in vitro. *Mol. Reprod. Dev* 1990; 26: 377-82
- Ng FLH, Liu DY, Baker HW. Comparison of Percoll, mini Percoll and swim –up methods for sperm preparation from semen samples. *Hum Reprod* 1992;7,261-266
- Niemann H, Rath D. Progress in reproductive biotechnology in swine. *Theriogenology* 2001;56:1291-1304
- Pavlok A. Penetration of hamsters and pig zona-free eggs by boar ejaculated spermatozoa preincubated in vitro. *Int. J. Fertil.* 1981;26: 101-106
- Rath D, Experiments to improve in vitro fertilization techniques for in vivo-matured porcine oocyte. *Theriogenology* 1992; 37: 885-96
- Rath D, Long CR, Dobrinsky JR, Welch GR, Schreier LL, and Johnson LA. In vitro production of sexed embryos for gender preselection : high-speed sorting of X- chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *J. Anim. Sci.* 1999; 35: 85-94
- Singh B, Zhang X, Armstrong DT. Porcine oocytes release cumulus-expansion enabling activity even though porcine cumulus expansion in vitro is independent of the oocyte. *Endocrinol.* 1993; 132:1860-62
- Singh B, Barbe GJ, Armstrong DT. Factors influencing resumption of meiotic maturation and cumulus expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 1993; 56:1370-75
- Stephoe PC and Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet.* 1978; 2:36
- Töpfer-Peterson E, Petroukina AH, Ekhlasi-Hundrieser M. Oocyte- sperm interaction. *Anim Reprod Sci* 2000;60/61:653-662
- VatziasG, Hagen DR. Effects of porcine follicular fluid and oviduct-conditioned media on maturation and fertilization of porcine oocytes in vitro. *Biol Reprod* 1999; 60:42-48
- Walters EM, Graves CN. Transportation and storage effects on porcine ovaries. *J Anim Sci* 1998; 76(Suppl 2): 69 abstr.

Wang WH, Niwa K, Okuda K. In vitro penetration of pig oocytes matured in culture by frozen thawed ejaculated spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1991; 93:291-496

Wang WH, Abeydeera LR, Han YM, Prather RS, Day BN. Morphologic evaluation and actin filament distribution in porcine embryos produced in vitro and in vivo. *Biol. Reprod.* 1999;60:1020-1028

Yanagamachi R. Mechanisms of fertilization in mammals. In: *Fertilization and Embryonic Development in vitro*. New York: Plenum Press. 1981; 81-187

Yoon KW, Shin TY, Park JI, Roh S, Lim JM, Lee BC, Hwang WS, Lee ES. Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids. *Reprod Fertil Dev* 2000;12:133-139

Yoshida M. In vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Jpn.J.Vet.Sci* 1987; 49:711-18

Yoshida M, Ishigaki K, Pursel V.G. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 1992; 31: 68-71

Yoshida M, Ishizaki Y, Kawagishi K, Bamba K, Kojima Y. Effect of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes in vitro and on their subsequent fertilizing and developmental capacity in vitro. *J Reprod Fertil* 1992; 95: 481-485

Yoshida M, Mizoguchi Y, Ishigaki K, Kojima T and Nagai T. Birth of piglets derived from in vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 1993; 39:1303-11

Yoshida M, Ishizaki Y, Kawagishi K. Blastocyst formation by pig embryos resulting from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *J Reprod Fertil* 1990;88:1-8

TABLAS

Tabla 1. Calidad de los complejos cúmulo ovocito con los tres métodos empleados^a

| Método | | Complejos Cúmulo Ovocito | | | | | |
|---------------|-----------------|---------------------------------|--------------------|-------|-----------------------|-------|----------------|
| Nombre | Duración | Folículos | Recuperados | | Aptos para MIV | | Calidad |
| Corte | 1.5 h | 183 | 130 | 71% | 112 | 61.2% | Aceptable |
| Punción | 1 h | 214 | 20 | 9.3% | 12 | 5.6% | Aceptable |
| Aspiración | 1 h | 185 | 40 | 21.5% | 28 | 15.1% | Inaceptable |

^a10 ovarios con cada método.

MIV, Maduración in vitro.

Tabla 2. Cambios en los tipos de complejos cúmulo ovocito durante la incubación en medio de maduración (n = 141) ^a

| Tipo | Número | | | % | | |
|------|----------------|------|------|----------------|------|------|
| | t ₀ | 24 h | 48 h | t ₀ | 24 h | 48 h |
| 1 | 7 | 10 | 22 | 5 | 7 | 16 |
| 2 | 10 | 12 | 10 | 7 | 8 | 7 |
| 3 | 52 | 36 | 29 | 37 | 26 | 21 |
| 4 | 18 | 33 | 27 | 13 | 23 | 19 |
| 5 | 54 | 50 | 51 | 38 | 36 | 37 |

^aObtenidos de 32 ovarios

Tabla 3. Complejos cúmulo ovocito aptos para fertilización in vitro ^a

| | |
|-----------|------------|
| Aislados | 201 |
| Incubados | 141 (100%) |
| Maduros | 108 (77%) |
| Elegidos | 90 (64%) |

^aObtenidos de 32 ovarios

FIGURAS

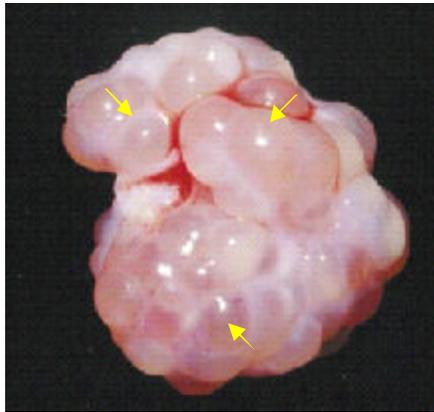


Fig. 1. Ovario porcino. Sobre su superficie son visibles los folículos apropiados para la extracción de ovocitos (flechas amarillas).



Fig. 2. Recuperación de CCO bajo el microscopio de disección. Con ayuda de una micropipeta de 100 μ l (lado derecho) es posible ir aislando los complejos cúmulo-ovocito (CCO) adecuados (flechas rojas) sea uno por uno o en grupos de 10.

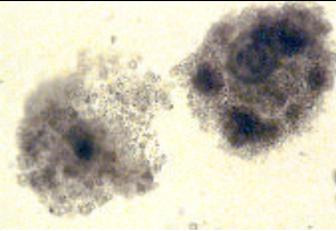
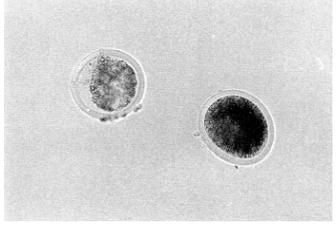
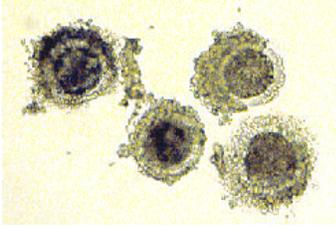
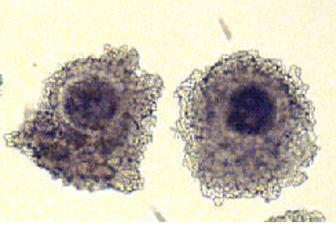
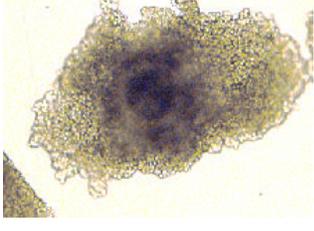
| Complejos cúmulo-ovocito (CCO) | | | |
|---------------------------------------|---|---|--------------------------------|
| Tipo | Aspecto | Descripción | Potencial de maduración |
| 1 |  | Ovocitos rodeados por células del cúmulo no compactas ni uniformes | Nulo |
| 2 |  | Ovocitos carentes de cúmulo | Nulo |
| 3 |  | Ovocitos con una cubierta incompleta de células del cúmulo compactas y uniformes | Medio/nulo |
| 4 |  | Ovocitos rodeados por al menos una capa de células del cúmulo compactas y uniformes | Alto/medio |
| 5 |  | Ovocitos rodeados por varias capas de células del cúmulo compactas y uniformes | Alto |

Fig. 3. Tipos, aspecto microscópico y potencial de maduración in Vitro de los complejos cúmulo-ovocito (CCO). Por su aspecto microscópico, los CCO se clasifican en los cinco tipos ejemplificados. Los óptimos para la maduración in vitro son los del tipo 5, aunque también son aceptables los tipos 3 y 4. (H. Niemann, oct 2004)

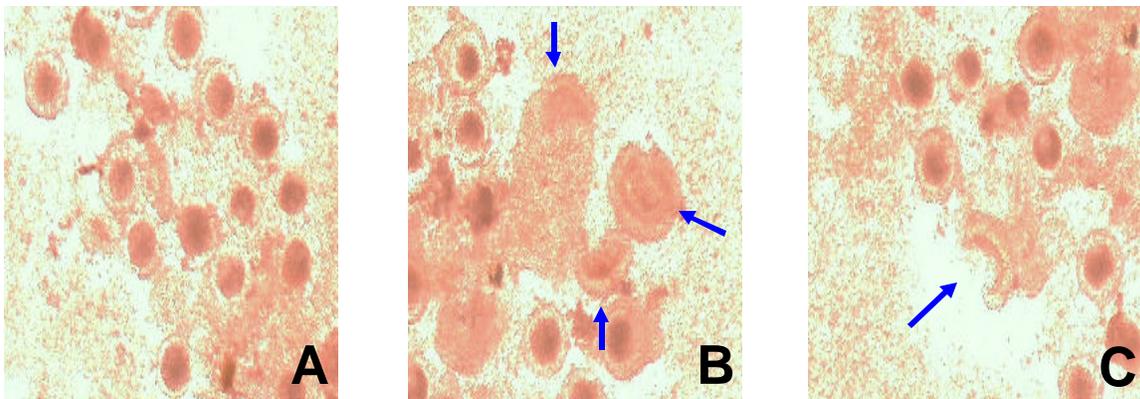
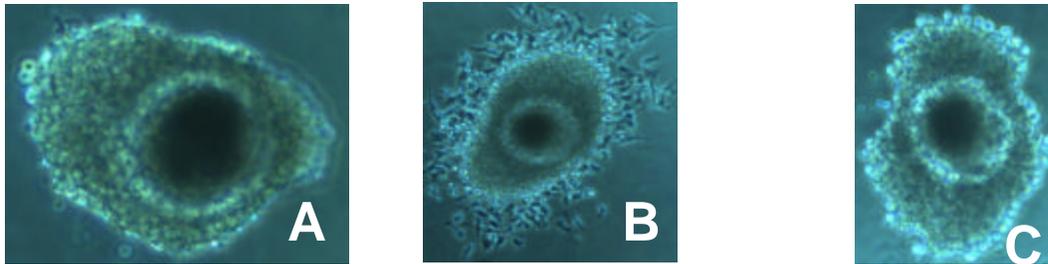
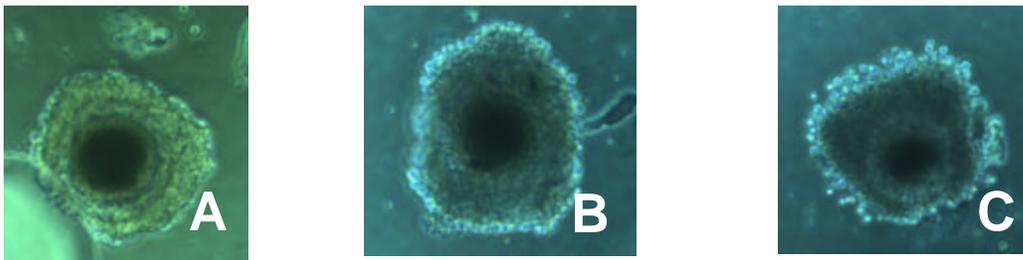


Fig 4. Calidad de los complejos cúmulo-ovocito (CCO) obtenidos con los tres métodos empleados. (A) Corte. La mayoría de los CCO estaban completos. **(B) Aspiración.** La mitad de los CCO estaban incompletos, principalmente por rupturas en células del cúmulo y pérdidas de ovocitos (flechas azules). **(C) Punción.** Alrededor del 20% de los CCO estaban rotos (flecha azul).

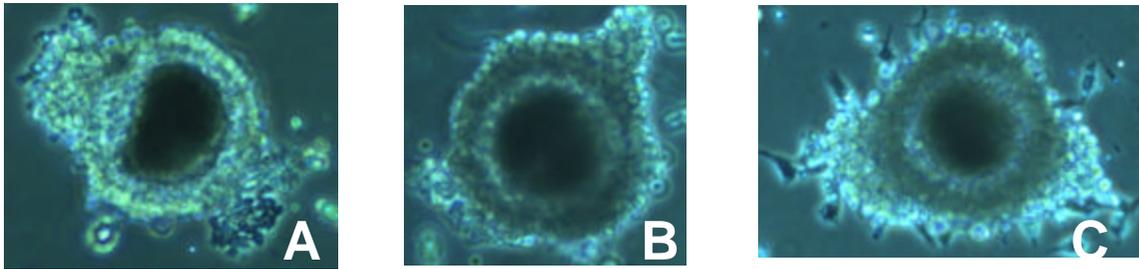


CCO tipo 5 que mantuvo el tipo durante la incubación. (A) t_0 . (B) a las 24 h aumentaron las células del cúmulo y algunas se adhirieron a la caja de Petri; **(C)** a las 48 h aumentaron las células del cúmulo y fue visible la zona pelúcida.

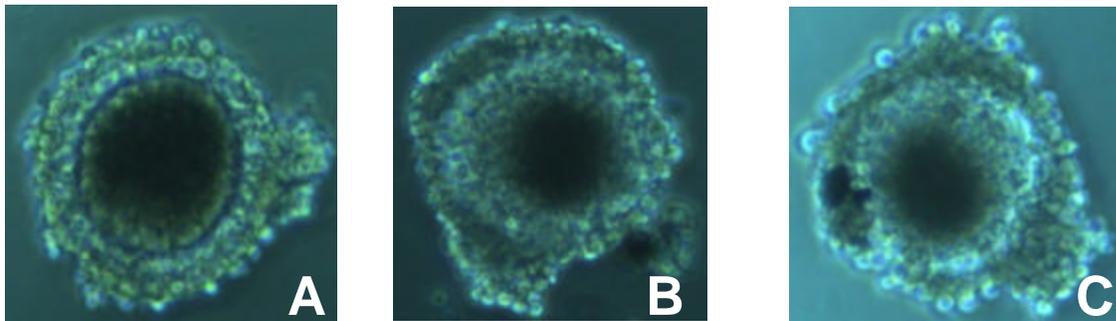


CCO tipo 4 que maduró a tipo 5. (A) t_0 . (B) a las 24 h aumentaron las células del cúmulo. **(C)** a las 48 h, CCO final tipo 5 en el cual aumentaron las células del cúmulo y fue visible la zona pelúcida.

Fig. 5. Ejemplos de maduración de CCO de los tipos 4 y 5 durante la incubación en medio de maduración. Las fotomicrografías muestran cambios morfológicos típicos de CCO tipos 5 y 4 (A), a las 24 h (B) y 48 h (C) de haber sido incubados en medio de maduración.

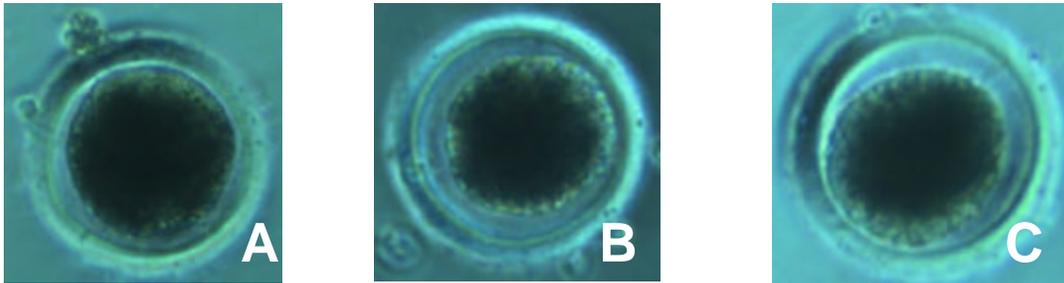


CCO tipo 3 que maduró a tipo 5. (A) t_0 . **(B)** a las 24 h aumentaron las células del cúmulo. **(C)** a las 48 h, CCO final tipo 5 en el cual aumentaron las células del cúmulo y fue visible la zona pelúcida.

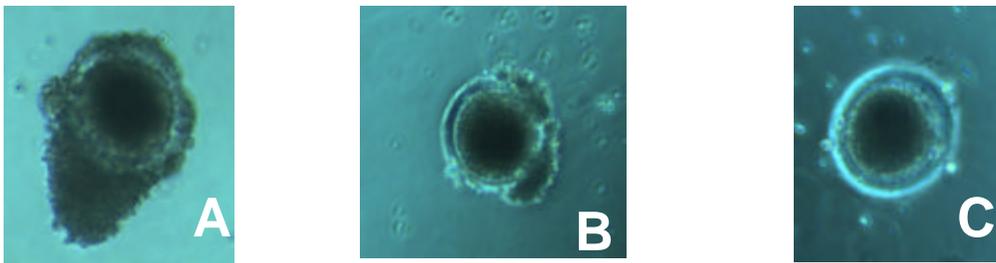


CCO tipo 3 que mantuvo el tipo. (A) t_0 . **(B)** a las 24 h aumentaron las células del cúmulo. **(C)** a las 48 h, CCO final tipo 3 en el que aumentaron ligeramente las células del cúmulo y fue visible la zona pelúcida.

Fig. 6. Ejemplos de la maduración de CCO tipo 3 durante la incubación en medio de maduración. Las fotomicrografías muestran cambios morfológicos típicos de CCO tipo 3 (A), a las 24 h (B) y 48 h (C) de haber sido incubados en medio de maduración.



CCO tipo 2 que mantuvo el tipo. (A) t_0 , CCO tipo 2 carente de células del cúmulo. **(B)** a las 24 h, CCO sin cambios aparentes. **(C)** a las 48 h, CCO final tipo 2 sin cambios aparentes.



Degradación de un CCO tipo 3. (A) t_0 , CCO tipo 3. **(B)** a las 24 h perdió la mayoría de las células del cúmulo. **(C)** a las 48 h, CCO final tipo 2 sin células del cúmulo.

Fig. 7. Ejemplos de degradación de CCO tipos 2 y 3 durante la incubación por 48 h en medio de maduración. Las fotomicrografías muestran cambios morfológicos típicos durante la degradación de los CCO tipo 2 y 3 (A), a las 24 h (B) y 48 h (C) de haber sido incubados en medio de maduración.

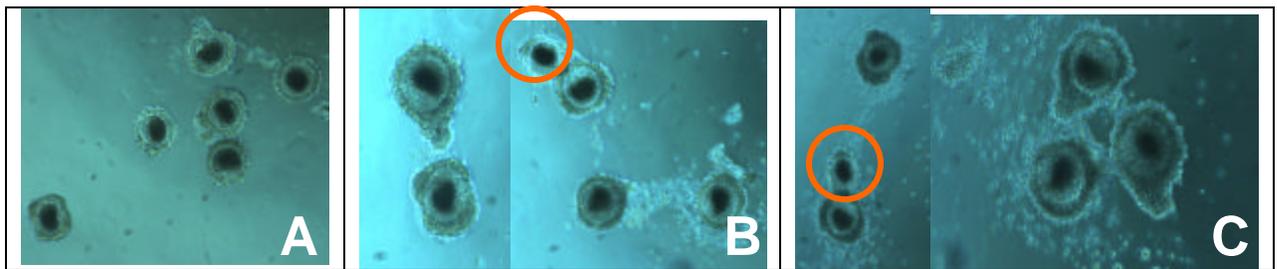
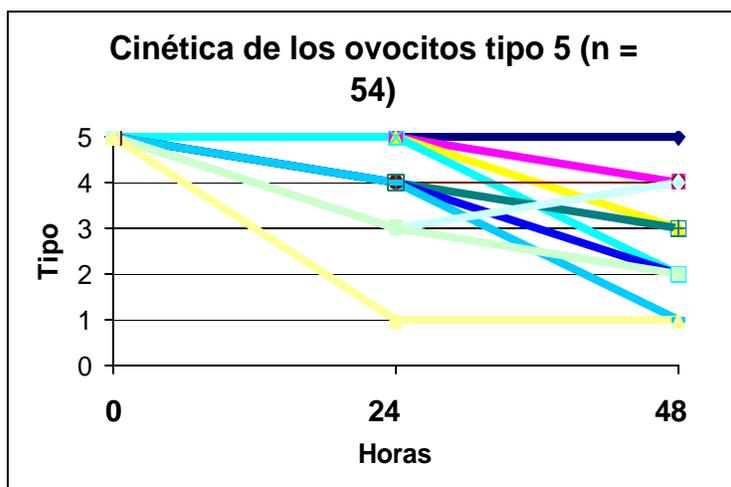
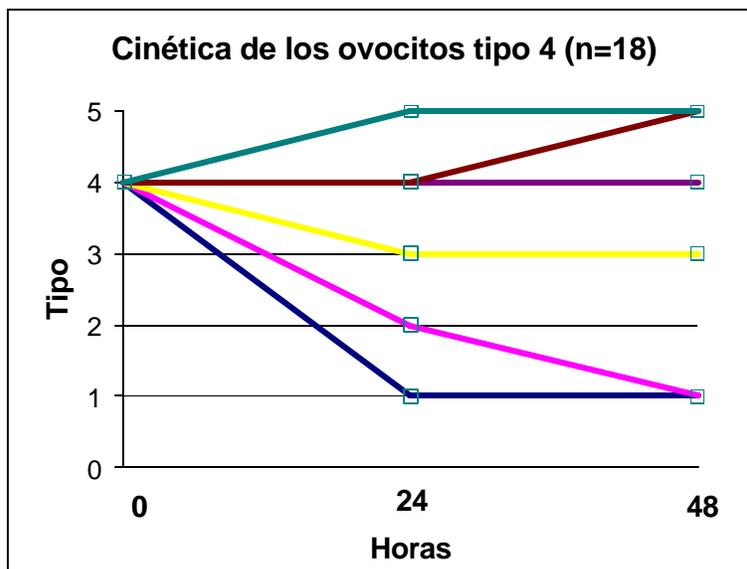


Fig. 8. Maduración grupal de CCO tipo 3 a tipo 5 y degradación de un CCO tipo 3 a 2. (A) t_0 , seis CCO tipo 3. **(B)** a las 24 h, cinco CCO con aumento de células del cúmulo, uno sin cambios (círculo rojo). **(C)** a las 48 h, cinco CCO tipo 5 y uno degradado a tipo 2 (círculo rojo).



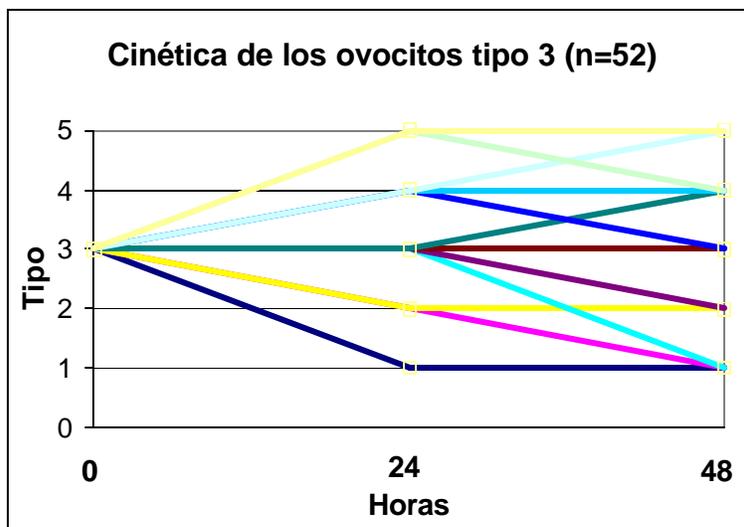
| Horas | | | Número | |
|--------------|----|----|-----------|------|
| 0 | 24 | 48 | | |
| 5 | 5 | 5 | 38 | 70% |
| 5 | 5 | 4 | 1 | 1.8% |
| 5 | 5 | 3 | 1 | 1.8% |
| 5 | 5 | 2 | 1 | 1.8% |
| 5 | 4 | 5 | 1 | 1.8% |
| 5 | 4 | 4 | 5 | 9.3% |
| 5 | 4 | 3 | 1 | 1.8% |
| 5 | 4 | 2 | 1 | 1.8% |
| 5 | 4 | 1 | 1 | 1.8% |
| 5 | 3 | 4 | 1 | 1.8% |
| 5 | 3 | 2 | 1 | 1.8% |
| 5 | 1 | 1 | 2 | 3.6% |
| Total | | | 54 | |

Fig. 9. Cinética de los cambios de CCO tipo 5 durante su incubación en medio de maduración por 24 y 48 h.



| Horas | | | Número |
|--------------|----|----|-----------|
| 0 | 24 | 48 | |
| 4 | 5 | 5 | 4 22% |
| 4 | 4 | 5 | 3 16% |
| 4 | 4 | 4 | 4 22% |
| 4 | 4 | 3 | 1 5.5% |
| 4 | 3 | 4 | 1 5.5% |
| 4 | 3 | 3 | 3 16% |
| 4 | 2 | 1 | 1 5.5% |
| 4 | 1 | 1 | 1 5.5% |
| Total | | | 18 |

Fig. 10. Cinética de los cambios de CCO tipo 4 durante su incubación en medio de maduración por 0, 24 y 48 h.



| | Horas | | | Número | |
|--------------|-------|----|-----------|--------|--|
| | 0 | 24 | 48 | | |
| 3 | 5 | 5 | 2 | 3.7% | |
| 3 | 5 | 4 | 2 | 3.7% | |
| 3 | 4 | 5 | 1 | 1.9% | |
| 3 | 4 | 4 | 10 | 19.2% | |
| 3 | 4 | 3 | 5 | 9.6% | |
| 3 | 3 | 4 | 2 | 3.7% | |
| 3 | 3 | 3 | 19 | 36.5% | |
| 3 | 3 | 2 | 2 | 3.7% | |
| 3 | 3 | 1 | 1 | 1.9% | |
| 3 | 2 | 2 | 1 | 1.9% | |
| 3 | 2 | 3 | 3 | 5.7% | |
| 3 | 3 | 2 | 1 | 1.9% | |
| 3 | 3 | 1 | 3 | 5.7% | |
| Total | | | 52 | | |

Fig. 11. Cinética de los cambios de CCO tipo 3 durante su incubación en medio de maduración por 24 y 48 h.

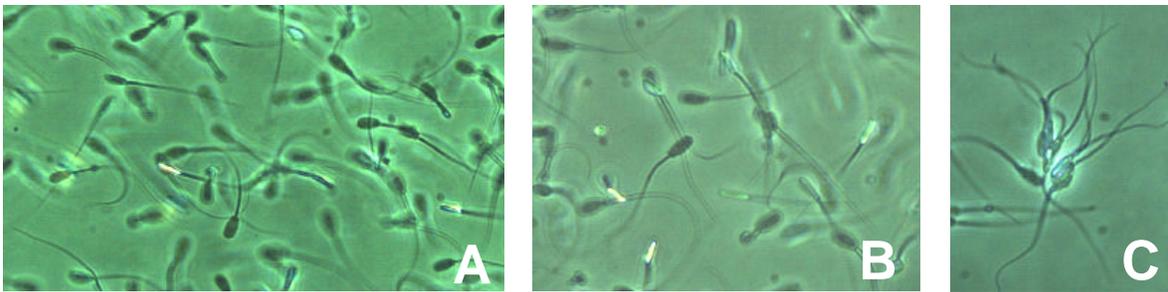


Fig. 12. Aspecto microscópico de los espermatozoides de cerdo antes y después de la capacitación. (A) Espermatozoides antes de la capacitación ($3 \times 10^6/\text{ml}$), mantenidos a 16°C en diluyente espermático; motilidad casi nula. (B) Espermatozoides capacitados ($15 \times 10^5/\text{ml}$) mediante incubación por 90 min en DMEM a 37°C ; la motilidad aumentó considerablemente. (C) Espermatozoides agregados por adhesión de las cabezas, 10 h después haber sido capacitados.

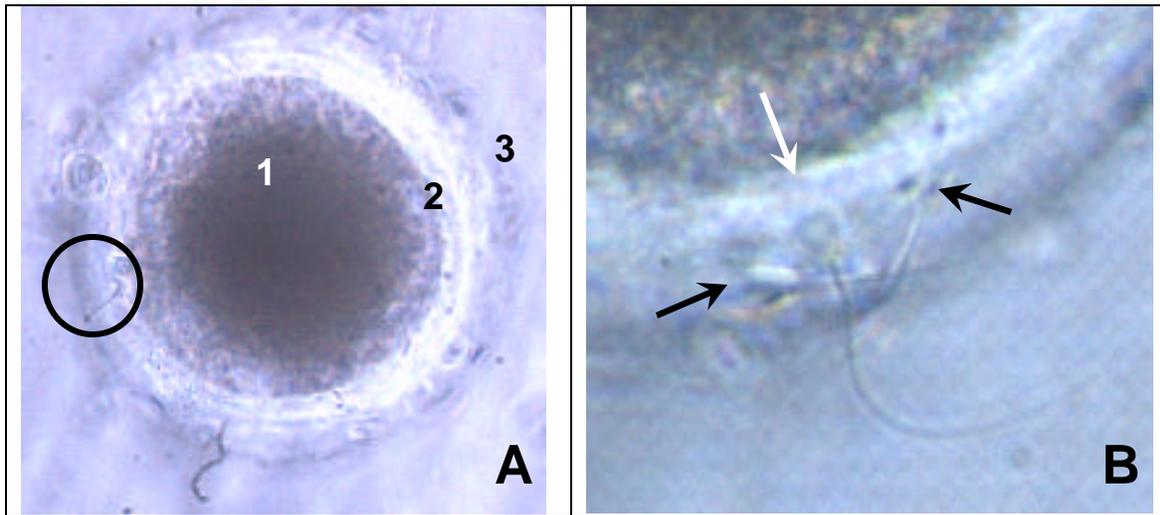


Fig. 13. Fertilización de ovocitos de cerdo con espermatozoides de cerdo capacitados. (A) Un espermatozoide capacitado penetrando el ovocito (círculo); 1, ovocito; 2, zona pelúcida; 3, células de la granulosa. **(B)** Acercamiento a un espermatozoide capacitado que está penetrando el ovocito (flecha blanca) y otros no penetrantes (flechas negras).

*I keep six honest serving men
(They taught me all I knew);
Their names are What and Why and When
And How and Where and Who.*

R. Kipling