



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

## EFFECTO DEL FORBOL 12-MIRIATATO 13-ACETATO EN LA REDUCCIÓN DE POLISPERMIA EN LOS OVOCITOS PORCINOS FERTILIZADOS *IN VITRO*

TRABAJO FINAL ESCRITO DE LA  
PRÁCTICA PROFESIONAL SUPERVISADA  
EN EL EXTRANJERO EN LA  
MODALIDAD DE REPRODUCCIÓN  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A :  
GABRIELA BENAVIDES VALADES

ASESOR: JOSÉ MANUEL BERRUECOS VILLALOBOS



MÉXICO, D.F.

2005

m. 342773



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Mi más sincero agradecimiento al Laboratorio de Reproducción Animal del departamento de Ciencia Animal de la Facultad de Agricultura y Ciencias Ambientales de la Universidad de McGill, campus Macdonald, en Québec, Canadá a cargo de Vilceu Bordignon, PhD, DVM y a la técnica laboratorista Limei Che DVM por su apoyo para realizar los experimentos contenidos en este trabajo.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>6</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>11</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>18</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>20</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>23</b>

## RESUMEN

BENAVIDES VALADES, GABRIELA. Efecto del forbol 12-miriatato 13-acetato en la reducción de polispermia en los ovocitos porcinos fertilizados *in vitro* (Bajo la dirección de José Manuel Berruecos Villalobos).

En el presente estudio se describe el proceso de producción *in vitro* de embriones porcinos, que comprende la maduración y fertilización de los ovocitos y el cultivo de los embriones. La polispermia es el principal problema en la fertilización *in vitro* en porcinos, por lo que en la fase experimental de este trabajo se evaluó el efecto de la adición del forbol 12-miriatato 13-acetato (PMA) en el medio de fertilización sobre las tasas de fertilización y polispermia. El PMA induce la activación de la proteína cinasa C y promueve la exocitosis de los gránulos corticales, lo que ocasiona el bloqueo de la zona pelúcida. Se utilizaron 413 ovocitos madurados *in vitro* a los que se les suplementó el medio de fertilización con 0.1, 1 o 10  $\mu\text{M}$  de PMA, a la hora 0, 3 y 5 post-inseminación. Una vez fertilizados, los ovocitos fueron cultivados *in vitro* durante 12 horas. Posteriormente se eliminó la zona pelúcida, se fijaron y tiñeron con Hoechst 33342, analizándose con epifluorescencia. En cada grupo se determinó la tasa de ovocitos en metafase II, con 2 pronúcleos, polispérmicos (más de 2 pronúcleos), activados por partenogénesis, fragmentados y con bloqueo espermático. El mayor porcentaje de fertilización normal se obtuvo al adicionar 0.1  $\mu\text{M}$  de PMA 5 horas post-inseminación (40% vs 27.5% del testigo), mientras que con 10  $\mu\text{M}$  de PMA a las 3 horas post-inseminación la tasa de polispermia fue la menor (10%). La tasa de fertilización y polispermia fue muy variable entre experimentos, atribuido esto a la calidad del semen por lo que no se pudo llegar a un resultado concluyente. Para experimentos posteriores se recomienda el uso de semen congelado probado, para minimizar la variabilidad entre las pruebas.

## INTRODUCCIÓN

El principal objetivo de la porcicultura es la producción de carne magra para el consumidor. La economía de una empresa porcina depende en gran medida de la eficiencia reproductiva de sus animales. Una tendencia importante a escala mundial se relaciona con el desarrollo de innovaciones e invenciones tecnológicas, que han llegado hasta el campo de la reproducción porcina. De esta forma se han desarrollado biotecnologías que incluyen inseminación artificial, sincronización de estros, inducción del parto, transferencia de embriones, criopreservación de ovocitos y embriones, sexaje espermático, sistemas de producción *in vitro*, disección embrionaria, transferencia nuclear, microinyección de DNA, inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), clonación y transgénesis (Niemann *et al.*, 2001; Bavister 2002; Wheeler *et al.*, 2004).

La producción *in vitro* (IVP\*) de embriones es una tecnología de reproducción asistida que se lleva a cabo en los laboratorios y abarca la maduración *in vitro* (IVM\*) y la fertilización *in vitro* (IVF\*) de los ovocitos, así como el cultivo *in vitro* (IVC\*) de los ovocitos fertilizados o cigotos, generando embriones viables con bajo costo y en menor tiempo, siendo de una importancia considerable por su aplicación en distintas áreas de la producción animal e investigación.

Los primeros experimentos de fertilización *in vitro* datan de 1878, pero no fue sino hasta 75 años más tarde cuando se tuvieron los primeros reportes exitosos. El descubrimiento de la capacitación espermática en 1951 por Chang y Austin, representó un gran avance en el desarrollo de la tecnología para la IVF (Bavister, 2002).

Thibault y Dauzier en 1961 reportaron la fertilización *in vitro* de un óvulo porcino; sin embargo, fue hasta 1985 que Cheng logró obtener la primera camada de lechones por IVF. En 1989 Mattioli *et al.*, demostraron que los ovocitos porcinos madurados y fertilizados *in vitro* podían desarrollarse hasta blastocistos. Posteriormente, Yoshida *et al.* (1993) obtuvieron una camada de lechones nacidos de embriones madurados, fertilizados y

---

\* Por sus siglas en inglés

cultivados *in vitro* de la etapa de 2 a 4 células. Fue hasta el año 2002 que Abeydeera publicó los protocolos que avalaron consistentemente los resultados de IVF con producción de crías, permitiendo realizar experimentos como manipulación génica, sexaje y clonación.

Actualmente la fertilización *in vitro* (IVF) se usa ampliamente para diversos propósitos: entre ellos, la producción de embriones utilizados en investigación, para tratamientos contra la infertilidad en humanos, para incrementar la productividad de los animales de abasto y para la conservación de animales en peligro de extinción.

Debido a la semejanza fisiológica con el humano, los cerdos han tomado creciente importancia como modelos animales con aplicaciones biomédicas, tales como desarrollo de fármacos, donadores xenogénicos y animales transgénicos para producir proteínas específicas.

A pesar de que la producción de embriones viables de cerdo por medio de IVF es ahora una rutina utilizando ovocitos madurados *in vitro* (IVM), aún se presentan los problemas de fertilización polispermica y el bajo porcentaje de formación de pronúcleo masculino en los ovocitos fertilizados (Wheeler *et al.*, 2004). Recientemente se ha comprobado que la síntesis de glutatión durante la maduración del ovocito, aumenta el porcentaje de formación de pronúcleo masculino, lo cual da una posible solución a este problema (Nagai, 1996).

En contraste, la polispermia, definida como la penetración de más de un espermatozoide en un ovocito, es aún un defecto de etiología incomprendida y ha habido pocos reportes acerca de la mejora de condiciones para lograr una fertilización monospérmica. La incidencia de polispermia en ovocitos porcinos *in vivo* es de 30 a 40%; sin embargo *in vitro*, la incidencia llega hasta el 65% (Wang *et al.*, 1998). Aunque los embriones porcinos polispermiáticos pueden desarrollarse hasta blastocistos, generalmente no llegan a término, ya que contienen una reducida masa celular interna, comparada con los embriones monospérmicos.

La fertilización *in vivo* ocurre dentro de pocas horas después de la ovulación y en la mayoría de los casos se da la penetración monospermica, en gran parte debida a que la relación óvulo-espermatozoide, al momento inicial de la penetración de las membranas del óvulo, es cercano a uno (Hunter, 1993).

Sin embargo, los ovocitos madurados *in vitro*, son expuestos a un número excesivo de espermatozoides por un período prolongado, condiciones que podrían predisponer a la polispermia; al reducir el número de espermatozoides en las gotas de fertilización, se obtienen bajas tasas de penetración en los ovocitos (Abeydeera, 2002).

El objetivo de un sistema de IVF exitoso es lograr una tasa de penetración alta (80%) con baja incidencia de polispermia (10%) (Abeydeera, 2002). Estudios recientes indican que el tipo de medio de maduración y fertilización y ciertas modificaciones a éstos, pueden reducir la polispermia. Como posibles métodos, se encuentran la adición de células porcinas del oviducto y secreciones (Nagai *et al.*, 1990; Kano *et al.*, 1994, Kim *et al.*, 1996), fluido folicular porcino (Funahashi *et al.*, 1993) y una glicoproteína específica semi-purificada del oviducto porcino (Kouba *et al.*, 1999). Sin embargo, ninguno de estos experimentos ha llegado a resultados concretos para lograr una fertilización monospermica eficiente.

Un punto importante a considerar en el problema de la polispermia es el papel que juegan los gránulos corticales. Éstos son unos organelos pequeños, localizados en la periferia del ovocito maduro que reaccionan al penetrar un espermatozoide, liberando su contenido por exocitosis al espacio perivitelino, produciendo el bloqueo en la zona pelúcida y evitando que entren más espermatozoides (Hoodbhoy *et al.*, 1994). Durante la maduración, se da la redistribución de los organelos internos del ovocito, por lo que lograr una distribución normal de los gránulos corticales durante la IVM puede ayudar a prevenir la polispermia.

Estudios realizados por Wang *et al.* (1998), sugieren que la polispermia en ovocitos porcinos producidos *in vitro* podría deberse a una reacción retrasada de la zona pelúcida

para bloquear a los demás espermatozoides, o bien, a la penetración simultánea de los espermatozoides.

La base molecular que regula la reacción cortical abarca a la proteína G (sistema de transducción de señal), una elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la proteína cinasa C (PKC, por sus siglas en inglés). Sun *et al.* (1997) y Fan *et al.* (2002) demostraron que la PKC es activada después de la penetración del espermatozoide, induciendo la exocitosis de los gránulos corticales de los ovocitos porcinos. Nishisuka (1984) reportó que el forbol 12-miriatato 13-acetato (PMA, por sus siglas en inglés) inducía directamente la activación de la PKC.

El objetivo de la investigación fue conocer el efecto del PMA en el medio de fertilización en 3 diferentes concentraciones y con diferentes tiempos post-inseminación con la finalidad de promover la exocitosis de los gránulos corticales y con esto, producir un bloqueo en la zona pelúcida para evitar la polispermia.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La producción *in vitro* de embriones porcinos, inicia con la colección de ovocitos de los ovarios de cerdas prepúberes con folículos antrales; se seleccionan los complejos cúmulo-ovocito y se maduran de 42 a 48 horas en un medio de maduración suplementado con hormonas y factores de crecimiento. Posteriormente se lleva a cabo la fertilización de los ovocitos y por último, el cultivo de los cigotos hasta la etapa de blastocisto.

Los experimentos contenidos en este trabajo fueron realizados en el Laboratorio de Reproducción Animal del departamento de Ciencia Animal de la Facultad de Agricultura y Ciencias Ambientales de la Universidad de McGill, campus Macdonald en Québec, Canadá, a cargo de Vilceu Bordignon, PhD, DVM.

### MÉTODO PARA LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS PORCINOS

El procedimiento de maduración *in vitro* de ovocitos comenzó colectando los ovarios de cerdas pre-púberes de un rastro local y se transportaron al laboratorio en solución salina (NaCl 0.9%) a una temperatura de 35°C. En el laboratorio se lavaron con solución salina y se colocaron en un recipiente a baño maría a 37°C. La colección de ovocitos se realizó por medio de aspiración con agujas hipodérmicas de calibre 19 y jeringa desechable de 10 ml. Se puncionaron los folículos antrales de 3 a 6 mm de diámetro y el líquido folicular colectado se dispuso en tubos cónicos<sup>a</sup> de 50 ml. Una vez terminada la punción se tapó el tubo y se dejó a baño maría por 15 min; el sedimento se lavó dos veces con el medio TALP-Hepes suplementado con 0.1% de Alcohol Polivinílico (PVA) (Anexo 1), desechando el sobrenadante.

---

<sup>a</sup> Corning, NY, USA

Posteriormente, el sedimento se completó con TALP-Hepes suplementado con 0.1% PVA para tener 40 ml y se depositaron en cajas de poliestireno de 100 x 15 mm rayadas longitudinalmente, para que sirvieran de guía en la selección del complejo ovocito-células del cúmulo (COCs). La colección se realizó en el microscopio estereoscópico con una pipeta de vidrio, seleccionando los ovocitos con citoplasma homogéneo y con mínimo 3 capas de células del cúmulo uniformes y compactas, depositándose en una caja de 35 x 10 mm con 2 ml de TALP-Hepes suplementado con 0.1% PVA.

Una vez terminada la selección, los COCs se lavaron en medio de maduración y cultivados en 600µl por pozo del mismo medio en una caja de 4 pozos<sup>a</sup>. El medio de maduración utilizado es el descrito por Kazuchika *et al.* (2002) (Anexo 2), compuesto a base de TCM 199<sup>b</sup> y suplementado con PVA, FSH, LH, EGF, Na piruvato, D-glucosa, cisteína y gentamicina. Se depositaron un máximo de 60 COCs por pozo y se incubaron a 38.5°C en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> en el aire por 22 horas. Posteriormente los COCs se cultivaron por otras 20 a 22 horas en el mismo medio, sin FSH y LH.

## **MÉTODO PARA LA FERTILIZACIÓN *IN VITRO***

### **PREPARACIÓN DE LOS OVOCITOS**

Después de la maduración, grupos de 25 a 30 ovocitos se transfirieron a 2 ml de TALP-Hepes y se removieron la mayoría de las células del cúmulo de los ovocitos por medio de varios pases por una pequeña pipeta. Los ovocitos se seleccionaron por la presencia del primer corpúsculo polar.

### **PREPARACIÓN DEL SEMEN**

La fracción rica en espermatozoides de un eyaculado se colectó del mismo semental cada semana por el método de mano enguantada y se filtró a través de una doble gasa para remover partículas de gel. Después de una hora a temperatura ambiente (25°C) se diluyó 1:2 con BTS (Beltsville Thawing Solution: Pursel y Johnson, 1975; Johnson y Garner,

---

<sup>a</sup> Nunc Inc., Roskilde, Denmark

<sup>b</sup> Gibco BRL, Life Technology Inc., Grand Island, NY, USA.

1984) (Anexo 3). Para la IVF el semen se trató con un gradiente Percoll de dos pasos de acuerdo al protocolo descrito por Grant *et al.* (1994) (Anexo 4). Se preparó el Percoll de 90% con una mezcla de 9:1 de Percoll<sup>a</sup>, 10X Porcine Gamete Medium (PGM: Yoshioka *et al.*, 2003) y adicionado con alcohol polivinílico. El gradiente Percoll se preparó en un tubo cónico de 15 ml<sup>b</sup> con la primera capa de 2 ml de Percoll 90%, la segunda capa de 2 ml de Percoll 45% y 1 ml del semen diluido en la parte superior. Se centrifugó a 2000 rpm por 20 minutos. El pellet de espermatozoides se resuspende con TCM-SR (Anexo 5) y se lavó por centrifugación a 1500 rpm por 5 minutos, procedimiento que se repitió 2 veces.

## FERTILIZACIÓN

Se usó como medio de fertilización IVF Tris, descrito por Berger y Horton (1988) (Anexo 6), consistiendo de NaCl, KCl, Tris<sup>c</sup>, D-glucosa, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, Na-piruvato, Teofilina y BSA. Los COCs fueron incubados por 8 horas con los espermatozoides a una concentración de  $20 \times 10^6$  espermatozoides / ml en microgotas de 100 µl de IVF Tris cubiertas con aceite mineral, incubándose a 38.5°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> en el aire. Cada gota contuvo de 25 a 30 ovocitos.

## MÉTODO PARA EL CULTIVO DE EMBRIONES

Después de la IVF, los ovocitos se enjuagaron 3 veces en el medio de cultivo Porcine Zygote Medium-3 (PZM-3) descrito por Yoshioka *et al.* (2002) (Anexo 7) y posteriormente se cultivaron en gotas de 25 µl de PZM-3 cubiertas con aceite mineral<sup>c</sup>, incubados a 38.5°C y 5% CO<sub>2</sub>, por 12 horas. Cada gota contuvo un máximo de 25 cigotos.

---

<sup>a</sup> Amersham-Biosciences Ltd, St Louis, MO, USA

<sup>b</sup> Corning, NY, USA

<sup>c</sup> Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

## MÉTODO PARA LA TINCIÓN DE HOECHST

Para determinar el nivel de formación de pronúcleo y el número de células, se removió la zona pelúcida de los ovocitos con pronasa<sup>a</sup> al 0.5% y se fijaron en 4% (p/v) de paraformaldehído en PBS por 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces en PBS con 0.1% de PVA por 3 minutos cada vez. Posteriormente se permeabilizaron con 0.5% (v/v) de Triton-X100<sup>a</sup> en PBS + BSA por 1 hora y se lavaron 3 veces en PBS con 0.1% de PVA por 3 minutos cada vez.

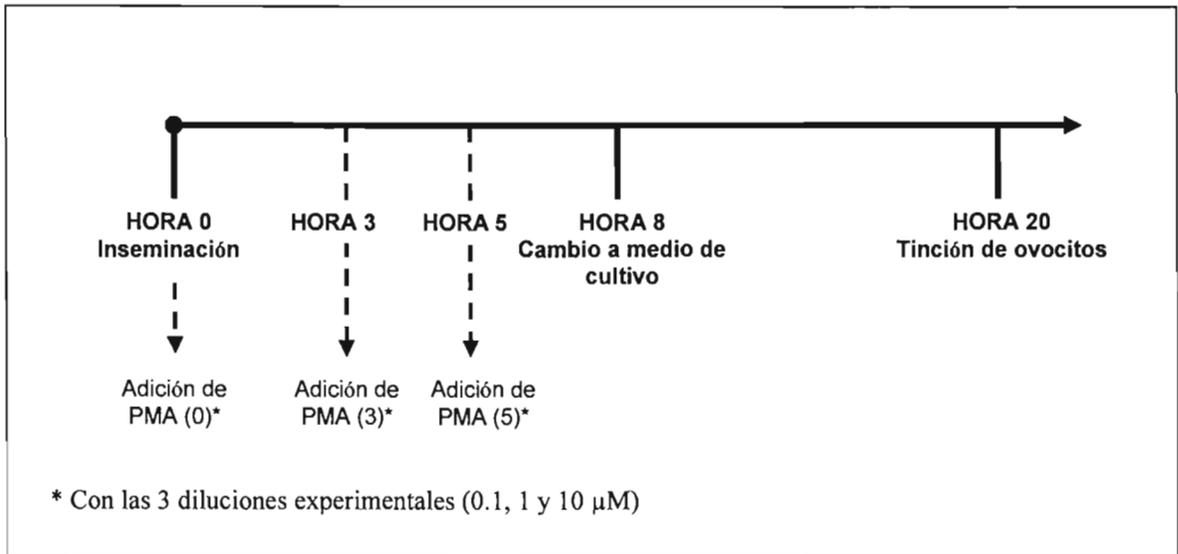
La cromatina se tiñó montando los ovocitos en laminillas con 10 µg/ml de Hoechst 33342<sup>a</sup> en maviol por 30 minutos y se analizaron con epifluorescencia.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Para conocer la concentración que induce la exocitosis de los gránulos corticales bloqueando la polispermia, a los ovocitos inseminados se les suplementó el medio de fertilización con 0.1, 1 o 10 µM de PMA<sup>a</sup> (Anexo 8). El tiempo de fertilización fue de la hora 0 a la 8 y el tratamiento con PMA se agregó a la hora 0, 3 y 5 post-inseminación (Figura 1). Después de las 8 horas, a los ovocitos se les cambió el medio y se cultivaron por 12 horas más, siendo a la hora 20 post-inseminación el fijado y tinción de los ovocitos para revisar los resultados, clasificándose de acuerdo a su estatus nuclear en ovocitos en metafase II, con 2 pronúcleos, polispermicos (3, 4, 5 o más de 5 pronúcleos), activados por partenogénesis, con citoplasma fragmentado y con bloqueo espermático.

---

<sup>a</sup> Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.



**Fig 1.** Esquema de tiempos y procedimientos.

## RESULTADOS

Después de llevar a cabo 4 experimentos (21 octubre 2004, 4 noviembre 2004, 11 noviembre 2004 y 2 diciembre 2004), según los procedimientos ya mencionados, se obtuvieron como resultado 413 ovocitos. La adición de PMA a la hora 0 con sus 3 diluciones experimentales se repitió 3 veces (21 octubre 2004, 4 noviembre 2004 y 11 noviembre 2004); mientras que a la hora 3 y 5, con las 3 diluciones experimentales correspondientes, solamente se realizó una vez (2 diciembre 2004).

El número y porcentaje de ovocitos según su estatus nuclear después del tratamiento con 0.1, 1 y 10  $\mu\text{M}$  de PMA a la hora 0, 3 y 5 post-inseminación se muestran en el Anexo 9. En la Anexo 10 se encuentran el número y porcentaje de ovocitos, según el efecto de 0.1, 1 o 10  $\mu\text{M}$  de PMA a la hora 0, 3 y 5 post-inseminación en ovocitos de IVF polispérmicos, de acuerdo al número de pronúcleos formados.

Con el promedio de los datos obtenidos en los 4 experimentos que se muestran en el Cuadro 1, se prepararon las gráficas que muestran el desempeño porcentual de cada una de las variables en estudio. Dado el bajo número de observaciones no se pretendió realizar un análisis estadístico, ya que éste podría mostrar resultados significativos a pesar de contar con un rango amplio de valores.

**Cuadro 1. Efecto por grupo de 0.1, 1 o 10  $\mu$ M de PMA a la hora 0, 3 y 5 post-inseminación en el estatus nuclear en ovocitos de IVF.**

<b>Tratamiento</b>	<b>#ovocitos</b>	<b># M II</b>	<b>% MII</b>	<b># Frag.</b>	<b>% Frag.</b>	<b># Act.</b>	<b>% Act.</b>	<b># 2 PN</b>	<b>% 2 PN</b>	<b># +2PN</b>	<b>% +2PN</b>	<b>#Bloq.</b>	<b>%Bloq.</b>
<b>Testigo</b>	102	28	<b>27.5</b>	3	<b>2.9</b>	10	<b>9.8</b>	28	<b>27.5</b>	33	<b>32.4</b>	0	<b>0.0</b>
<b>PMA 10,0' (a)</b>	57	25	<b>43.9</b>	2	<b>3.5</b>	1	<b>1.8</b>	14	<b>24.6</b>	12	<b>21.1</b>	3	<b>5.3</b>
<b>PMA 1,0' (a)</b>	74	14	<b>18.9</b>	2	<b>2.7</b>	3	<b>4.1</b>	8	<b>10.8</b>	43	<b>58.1</b>	4	<b>5.4</b>
<b>PMA 0.1,0' (a)</b>	75	2	<b>2.7</b>	2	<b>2.7</b>	5	<b>6.7</b>	22	<b>29.3</b>	43	<b>57.3</b>	1	<b>1.3</b>
<b>PMA 10,3' (b)</b>	10	5	<b>50.0</b>	1	<b>10.0</b>	2	<b>20.0</b>	1	<b>10.0</b>	1	<b>10.0</b>	0	<b>0.0</b>
<b>PMA 1,3' (b)</b>	9	2	<b>22.2</b>	1	<b>11.1</b>	0	<b>0.0</b>	1	<b>11.1</b>	5	<b>55.6</b>	0	<b>0.0</b>
<b>PMA 0.1,3' (b)</b>	17	2	<b>11.8</b>	4	<b>23.5</b>	1	<b>5.9</b>	4	<b>23.5</b>	6	<b>35.3</b>	0	<b>0.0</b>
<b>PMA 10,5' (c)</b>	26	11	<b>42.3</b>	3	<b>11.5</b>	0	<b>0.0</b>	1	<b>3.8</b>	8	<b>30.8</b>	3	<b>11.5</b>
<b>PMA 1,5' (c)</b>	23	8	<b>34.8</b>	3	<b>13.0</b>	1	<b>4.3</b>	5	<b>21.7</b>	4	<b>17.4</b>	2	<b>8.7</b>
<b>PMA 0.1,5' (c)</b>	20	4	<b>20.0</b>	0	<b>0.0</b>	1	<b>5.0</b>	8	<b>40.0</b>	7	<b>35.0</b>	0	<b>0.0</b>

(a) Promedio de 3 experimentos: 21-Oct-04, 04-Nov-04 y 11-Nov-04; (b) Resultado de 1 experimento: 02-Dic-04; (c) Resultado de 1 experimento: 02-Dic-04

Tratamiento: substancia suplementada, concentración en  $\mu$ M, hora de administración post-inseminación

#ovocitos: Número de ovocitos en cada grupo

# M II: Número de ovocitos en metafase II

% M II: Porcentaje de ovocitos en metafase II

# Frag. : Número de ovocitos fragmentados

% Frag. : Porcentaje de ovocitos fragmentados

# Act. : Número de ovocitos activados por partenogénesis

% Act.: Porcentaje de ovocitos activados por partenogénesis

# 2 PN: Número de ovocitos con 2 pronúcleos

% 2 PN: Porcentaje de ovocitos con 2 pronúcleos

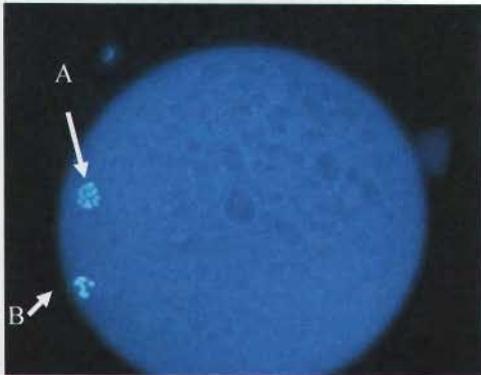
# +2PN: Número de ovocitos con más de 2 pronúcleos

% +2PN: Porcentaje de ovocitos con más de 2 pronúcleos

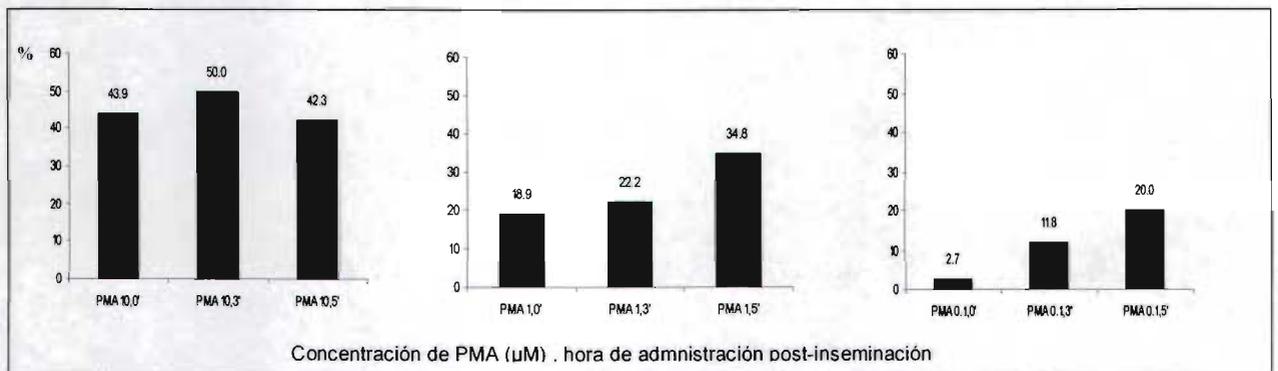
# Bloq. : Número de ovocitos con bloqueo espermático

% Bloq.: Porcentaje de ovocitos con bloqueo espermático

Los ovocitos en metafase II, son aquellos que maduraron, es decir presentaban corpúsculo polar, pero no fueron fertilizados (Imagen 1). El porcentaje de ovocitos en metafase II, se muestra en la gráfica 1, obteniéndose mayores porcentajes con la concentración de 10  $\mu$ M de PMA, independientemente de la hora en que se adicionó.

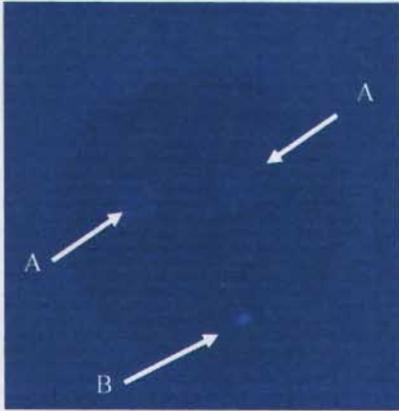


**Imagen 1.** Ovocito porcino en metafase II, después de ser removida la zona pelúcida. Se aprecia el corpúsculo polar (A) y el núcleo fluorescente (B).

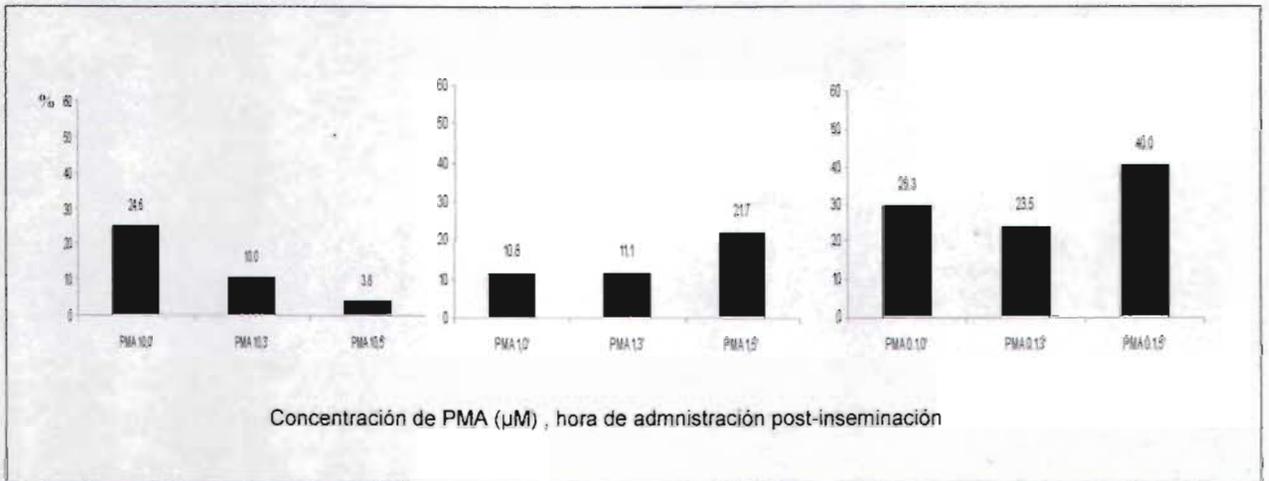


**Gráfica 1.** Porcentaje de ovocitos en metafase II, después del tratamiento con diferentes concentraciones de PMA y a diferentes tiempos.

Se contaron como ovocitos fertilizados normales, aquellos que presentaban dos pronúcleos fluorescentes, sin presencia intracitoplasmática de espermatozoides después de la tinción de Hoechst (Imagen 2). El porcentaje de ovocitos con dos pronúcleos, se muestra en la gráfica 2, siendo el tratamiento con 0.1  $\mu$ M PMA, adicionado a la hora 5 post-inseminación, el que indujo una mayor proporción (40%) de fertilizaciones normales.

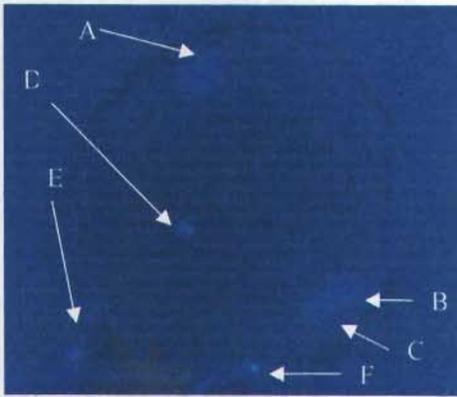


**Imagen 2.** Ovocito porcino con dos pronúcleos (A) y un corpúsculo polar (B), el segundo corpúsculo polar se perdió al ser removida la zona pelúcida.

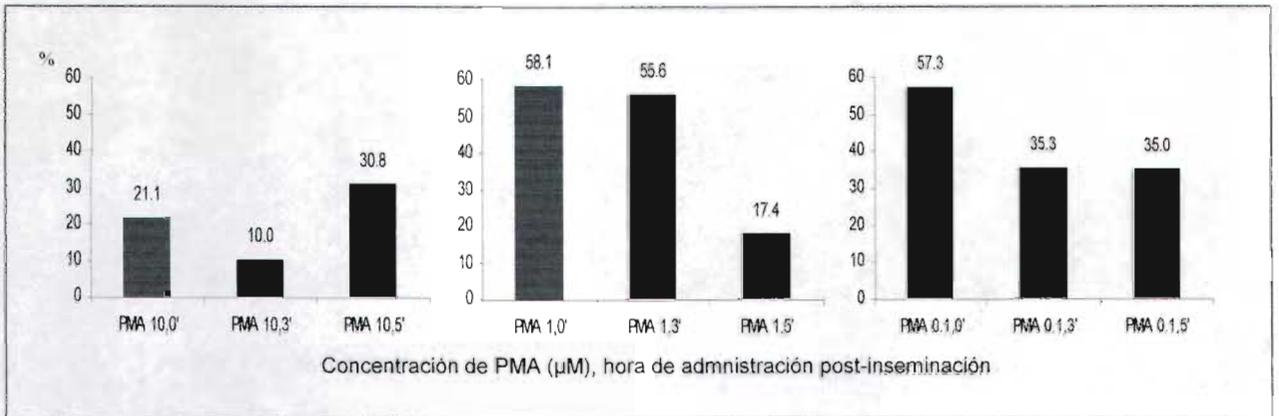


**Gráfica 2.** Porcentaje de ovocitos con 2 pronúcleos, después del tratamiento con diferentes concentraciones de PMA y a diferentes tiempos.

Los ovocitos con fertilización polispérmica, son los que presentaron más de dos pronúcleos fluorescentes, contando también como pronúcleo, las cabezas espermáticas descondensándose (Imagen 3). El porcentaje de ovocitos polispérmicos se muestra en la gráfica 3, obteniéndose en conjunto los menores porcentajes con la concentración de 10 µM de PMA.



**Imagen 3.** Ovocito porcino con 3 pronúcleos (A, B, C), 2 cabezas de espermatozoides (D, E) y un corpúsculo polar (F), el segundo corpúsculo polar se perdió al ser removida la zona pelúcida.

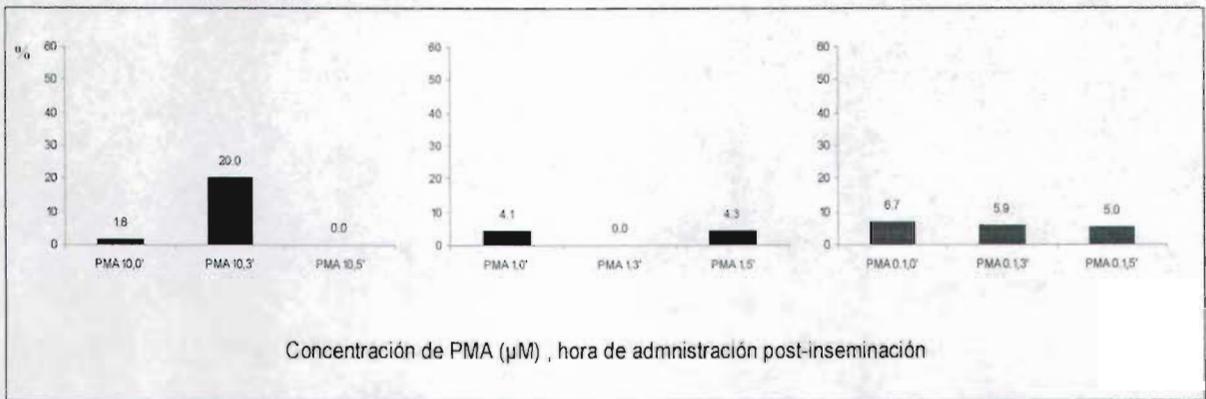


**Gráfica 3.** Porcentaje de ovocitos con más de 2 pronúcleos, después del tratamiento con diferentes concentraciones de PMA y a diferentes tiempos.

Se contaron como ovocitos activados o partenogénicos, aquellos que presentaban un pronúcleo fluorescente y no había presencia de espermatozoides dentro del citoplasma (Imagen 4). La gráfica con los porcentajes de ovocitos activados por partenogénesis, se muestra en la gráfica 4. En ésta podemos observar que con el tratamiento de 10 μM de PMA adicionado 3 horas después de la inseminación, se presenta en una proporción del 20%, la más alta de los 9 tratamientos.

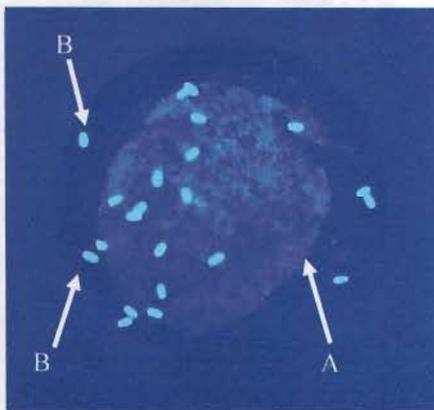


**Imagen 4.** Ovocito porcino con un pronúcleo, después de ser removida la zona pelúcida, mostrando la ausencia de espermatozoides dentro del citoplasma.

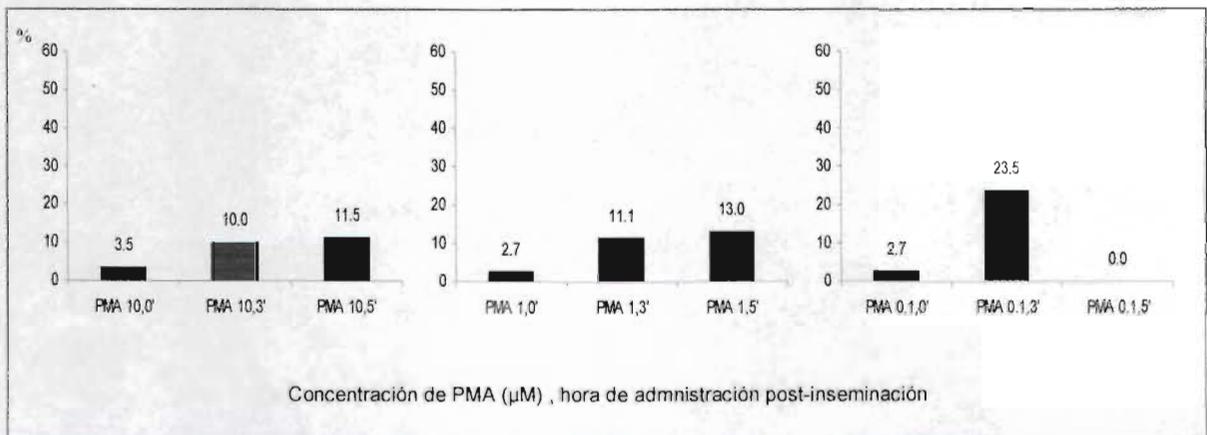


**Gráfica 4.** Porcentaje de ovocitos activados o partenogénicos, después del tratamiento con diferentes concentraciones de PMA y a diferentes tiempos.

Los ovocitos fragmentados son aquellos que presentaron citoplasma dividido o incompleto (Imagen 5). El porcentaje de ovocitos fragmentados, se muestra en la gráfica 5.

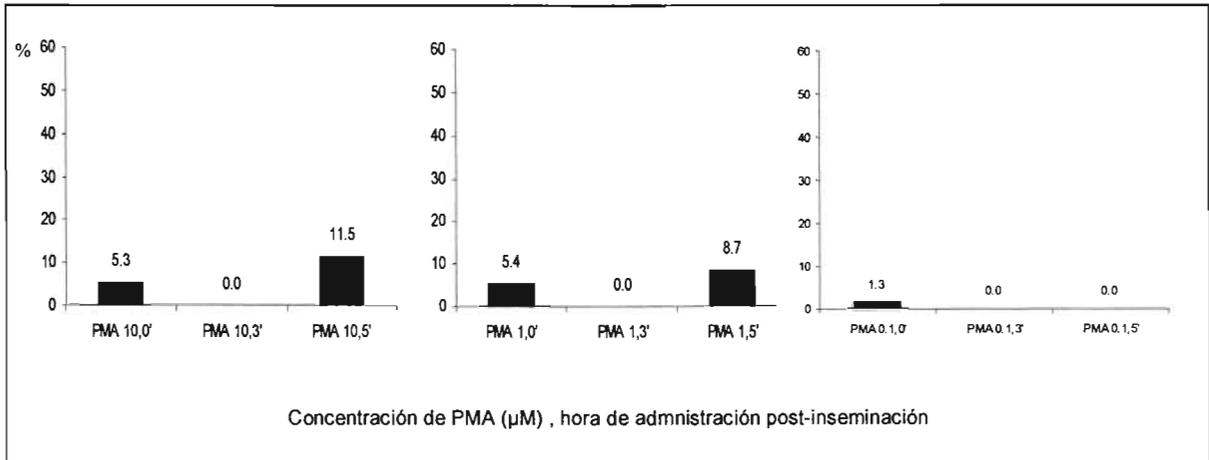


**Imagen 5.** Ovocito porcino con citoplasma fragmentado (A). No se removió la zona pelúcida por lo que se presentan cabezas de espermatozoides adheridas a la ZP (B).



**Gráfica 5.** Porcentaje de ovocitos fragmentados, después del tratamiento con diferentes concentraciones de PMA y a diferentes tiempos.

Se consideraron con bloqueo espermático, los ovocitos que presentaban un pronúcleo y la presencia de una cabeza de espermatozoide no descondensada dentro del citoplasma. El porcentaje de ovocitos con bloqueo espermático se muestra en la gráfica 6.



**Gráfica 6.** Porcentaje de ovocitos con bloqueo espermático, después del tratamiento con diferentes concentraciones de PMA y a diferentes tiempos.

## DISCUSIÓN

La fertilización normal es la combinación de un óvulo y un solo espermatozoide, por lo que la penetración de más de un espermatozoide se considera anormal. La incidencia de la polispermia en cerdos es muy alta *in vivo* e *in vitro*, comparada con otras especies.

La reacción de la zona pelúcida asociada a la exocitosis de los gránulos corticales es el principal mecanismo de protección contra la polispermia; se ha reportado que la polispermia en cerdos podría ser el resultado de un retraso en la exocitosis de los gránulos corticales y que esta reacción está correlacionada con un aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y la activación de la proteína cinasa C (PKC) (Wang *et al.*, 1998).

En el presente estudio, se usó el tratamiento con forbol 12-miriatato 13-acetato (PMA) en el medio de fertilización en 3 diferentes concentraciones (0.1, 1 o 10  $\mu\text{M}$ ) y en 3 diferentes tiempos post-inseminación (hora 0, 3 y 5) para inducir directamente la activación de PKC y promover la exocitosis de los gránulos corticales produciendo el bloqueo en la zona pelúcida y así evitar la polispermia.

De acuerdo a los resultados, se encontró que el uso de 0.1  $\mu\text{M}$  de PMA después de 5 horas de inseminar los ovocitos, producía el mayor número de ovocitos fertilizados normalmente con 2 pronúcleos. Sin embargo, se considera que estos resultados no son válidos ya que los espermatozoides capacitados son capaces de penetrar los ovocitos porcinos dentro de las 2 a 3 primeras horas, después de exponerlos a los ovocitos (Nagai *et al.*, 1993; Abeydeera *et al.*, 1997), por lo que el efecto después de 5 horas no es relevante. El experimento de la hora 3 y 5 sólo se realizó una vez, por lo que los resultados no son concluyentes.

El tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  presentó bajo porcentaje de polispermia, sin embargo también tuvo un alto porcentaje de ovocitos no fertilizados, lo que sugiere que reduce la polispermia pero también la tasa de fertilidad.

Con los datos obtenidos no se pudo llegar a un resultado claro, ya que la tasa de fertilización y polispermia fue muy variable entre experimentos. Esto se puede atribuir principalmente a la calidad del semen, que aunque era del mismo semental, se sabe que se presentan diferencias entre eyaculados, como ya señalaron Sirard *et al.* (1993) y Xu *et al.* (1996). Por lo anterior, se recomienda el uso de semen congelado probado, para minimizar o eliminar la variabilidad entre las pruebas.

En conclusión, no se tiene suficiente evidencia para afirmar que el tratamiento con el forbol 12-miriatato 13 acetato reduce la polispermia en los ovocitos porcinos fertilizados *in vitro*.

## LITERATURA CITADA

- 1) **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: 729-734.
- 2) **Abeydeera LR.** *In vitro* production of embryos in swine. *Theriogenology* 2002; 57: 257-273.
- 3) **Bavister BD.** Early history of *in vitro* fertilization. *Reproduction* 2002; 124: 181-196.
- 4) **Berger T, Horton MB.** Evaluation of assay conditions for the zona free hamster ova bioassay of boar sperm fertility. *Gamete Res* 1988; 19: 101-111.
- 5) **Cheng WTK.** *In vitro* fertilization of farm animal oocytes (Tesis no publicada de doctorado). United Kingdom: AFRC Institute of Animal Physiology, Cambridge. 1985.
- 6) **Fan HY, Tong C, Li MY, Lian L, Chen DY, Schatten H, Sun QY.** Translocation of the classic protein kinase C isoforms in porcine oocytes: implications of protein kinase C involvement in the regulation of nuclear activity and cortical granule exocytosis. *Exp Cell Res* 2002; 277: 183 – 191.
- 7) **Funahashi H, Day BN.** Effects of follicular fluid at fertilization *in vitro* on sperm penetration in pig oocytes. *J Reprod Fertil* 1993; 99: 97–103.
- 8) **Grant SA, Long SE, Parkinson TJ.** Fertilizability and structural properties of boar spermatozoa prepared by Percoll gradient centrifugation. *J Reprod Fertil* 1994; 100: 477- 483.
- 9) **Hoodboy T, Talbot P.** Mammalian cortical granules: contents, fate, and function. *Mol Reprod Dev* 1994; 39: 439- 448.
- 10) **Hunter RHF.** Sperm: egg ratios and putative molecular signals to modulate gamete interactions in polytocous mammals. *Mol Reprod Dev* 1993; 35: 324- 327.
- 11) **Johnson LA, Garner DL.** Evaluation of cryopreserved porcine spermatozoa using flow cytometry. *Prod Soc Anal Cytol*, Analytical cytology X Supplement, 1984; A-12, Abstr.

- 12) **Kano K, Miyano T, Kato S.** Effect of oviductal epithelial cells on fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 1994; 42: 1061–1068.
- 13) **Kazuchika M, Rzucidlo SJ, Pratt SL, Stice SL.** Utility of rapidly matured oocytes as recipients for production of cloned embryos from somatic cells in the pig. *Biol Reprod* 2002; 67: 540-545.
- 14) **Kim NH, Funahashi H, Abeydeera LR, Moon SJ, Prather RS, Day BN.** Effects of oviductal fluid on sperm penetration and cortical granule exocytosis during *in vitro* fertilization of porcine oocytes. *J Reprod Fertil* 1996; 107: 79–86.
- 15) **Kouba AJ, Abeydeera LR, Alvarez IM, Day BN, Bui WC.** Effects of porcine oviduct-specific glycoprotein pOSP on fertilization and polyspermy. *Biol Reprod Suppl.* 1999; 60: 228. Abstr.
- 16) **Mattioli M, Bacci ML, Galeati G, Seren E.** Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 1989; 39: 1201-1207.
- 17) **Nagai T.** *In vitro* maturation and fertilization of pig oocytes. *Anim Reprod Sci* 1996; 42: 153 -163.
- 18) **Nagai T, Miura K, Kikuchi K, Okamura N.** Effect of caffeine on *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes. *J Reprod Dev* 1993; 39: 347 – 352.
- 19) **Nagai T, Moor RM.** Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 377 – 382.
- 20) **Niemann H, Rath D.** Progress in reproductive biotechnology in swine. *Theriogenology* 2001; 56: 1291 – 1304.
- 21) **Nishizuka Y.** The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 1984; 308: 693 – 398.
- 22) **Pursel VG, Johnson LA.** Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim. Sci* 1975; 40: 99–102.
- 23) **Sirard MA, Dubuc A, Bolamba D, Zheng Y, Coenen K.** Follicle-oocyte-sperm interactions *in vivo* and *in vitro* in pigs. *J Reprod Fertil Suppl* 1993; 48:3-16.
- 24) **Sun QY, Wang WH, Hosoe M, Taniguchi T, Chen DY, Shioya Y.** Activation of protein kinase C induces cortical granule exocytosis in a Ca<sup>2+</sup> independent manner, but not the resumption of cell cycle in porcine eggs. *Dev Growth Differ* 1997; 39: 523- 529.

- 25) **Thibault C and Dautzier L.** Analyse des conditions de la fécondation *in vitro* de l'oeuf de la lapine. *Annales de la Biologie Animale et de Biochimie et Biophysique* 1961; 1: 277–294.
- 26) **Wang WH, Abeydeera LR, Prather RS, Day BN.** Morphologic comparison of ovulated and *in vitro*-matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after *in vitro* fertilization. *Mol Reprod Dev* 1998; 49: 377- 382.
- 27) **Wheeler MB, Clark SG, Beebe DJ.** Development in *in vitro* technologies for swine embryo production. *Reprod Fertil Dev* 2004; 16: 15-25.
- 28) **Xu X, Ding J, Seth PC, Harbison DS, Foxcroft GR.** In vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes: effects of boar and ejaculate fraction. *Theriogenology* 1996; 45: 745- 755.
- 29) **Yoshida M, Mizoguchi Y, Ishiaki K, Kojima T, Nagai T.** Birth of piglets derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 1993; 39: 1303-1311.
- 30) **Yoshioka K, Suzuki C, Itoh S, Kikuchi K, Iwamura S, Rodriguz-Martinez H.** Production of piglets derived from *in vitro*- produced blastocysts fertilized and cultured in chemically defined media: effects of theophylline, adenosine, and cysteine during *in vitro* fertilization. *Biol Reprod* 2003; 69: 2092-2099.
- 31) **Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IMK, Iwamura S.** Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol Reprod* 2002; 66: 112-119.

## ANEXO 1

### MEDIO TYORODE'S DE ALBUMINA LACTATO PIRUVATO – HEPES (TYRODE'S ALBUMIN LACTATE PYRUVATE - HEPES: TALP-HEPES) SUPLEMENTADO CON 0.1% PVA

#### STOCK A

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
NaCl	6660 mg
KCl	240 mg
NaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	100 mg
Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	54 mg
Lactato sódico	1.85 ml
Agua millipore	96.15 ml
Gentamicina	50 mg
Rojo de fenol	2.0 ml

#### STOCK B

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.450 g

#### STOCK C

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Hepes <sup>a</sup>	2.4 g

#### TALP-HEPES + 0.1% PVA

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
NaHCO <sub>3</sub>	16.8 mg
Glucosa	90 mg
Sorbitol	800 mg
Agua millipore	79 ml
Stock A	10 ml
Stock B	1 ml
Stock C	10 ml
Alcohol polivinílico (PVA)	300 mg

---

<sup>a</sup> Gibco BRL, NY.

## ANEXO 2

### MEDIO DE MADURACIÓN *IN VITRO*

#### TCM-199 STOCK

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
TCM 199 <sup>a</sup>	100 ml
Gentamicina	50 µl

#### MEDIO DE MADURACIÓN *IN VITRO*<sup>b</sup>

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	5 ml	10 ml
TCM-199 stock		4.93 ml	9.86 ml
Cisteína 10%	0.57 Mm	5 µl	10 µl
Na-piruvato	0.91 mM	50 µl	100 µl
D-glucosa	3.05 mM	0.0028 g	0.0056 g
Hormona Folículo	0.5 mg/ml	5 µl	10 µl
Estimulante (FSH) <sup>c</sup>			
Hormona Luteinizante (LH) <sup>c</sup>	0.5 mg/ml	5 µl	10 µl
Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) <sup>a</sup>	10 ng/ml	5 µl	10 µl
Alcohol polivinílico (PVA)	0.1%	0.0050 g	0.0100 g

<sup>a</sup> Gibco BRL, NY.

<sup>b</sup> Protocolo publicado por Kazuchika *et al.*, 2002.

<sup>c</sup> Sioux Biochemicals, Sioux Center, IA.

### ANEXO 3

#### SOLUCIÓN DESCONGELANTE BELTSVILLE (BELTSVILLE THAWING SOLUTION: BTS)<sup>a</sup>

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Glucosa	37.0 g/l
Citrato sódico	6.0 g/l
EDTA	1.25 g/l
Bicarbonato sódico	1.25 g/l
Cloruro de potasio	0.75 g/l
Gentamicina	500 µL
pH 7.2    330mOsm    Filtrar	

---

<sup>a</sup> Protocolo publicado por Pursel y Johnson, 1975; Johnson y Garner, 1984.

## ANEXO 4

### GRADIENTE PERCOLL

#### MEDIO PARA GAMETOS PORCINOS (PORCINE GAMETE MEDIUM: PGM-10X) STOCK<sup>a</sup>

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	
Agua milipore		100 ml
NaCl	108 mM	6.3115 g
KCl	10 mM	0.7455 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.4 mM	0.0986 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.35 mM	0.0476 g
NaHCO <sub>3</sub>	25.07 mM	2.1050 g
D-Glucosa	1 mM	0.1802 g
Gentamicina	50 µl/ml	500 µl
Ca-Lactato . 5H <sub>2</sub> O	2.5 mM	0.7708 g
(Agregar al final)		

#### PGM 10X

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	
PGM 10x stock		10 ml
Na-piruvato		0.0022 g

#### PGM 1X

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	
Agua milipore		9 ml
PGM 10X sol		1 ml
Cisteína stock		1 µl
PVA		0.0300 g
pH 7.4	Filtrar	

---

<sup>a</sup> Protocolo publicado por Yoshioka *et al.*, 2003.

**PERCOLL 90% <sup>a</sup>**

<b>REACTIVO</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
Percoll <sup>b</sup>	9 ml
PGM 10X Sol	1 ml
PVA	0.0300 g
*Filtrar	

**PERCOLL 45% <sup>a</sup>**

<b>REACTIVO</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
Percoll 90%	3 ml
PGM 1X Sol	3 ml

---

<sup>a</sup> Protocolos publicados por Grant *et al.*, 1994.

<sup>b</sup> Amersham-Biosciences Ltd, St Louis, MO, USA.

## ANEXO 5

### SOLUCIÓN DE ENJUAGE DE ESPERMATOZOIDES (SPERM RINSING SOLUTION: TCM-SR)<sup>a</sup>

REACTIVO	CONCENTRACIÓN		
TCM 199 stock (Anexo 1)		17.6 ml	
Na-piruvato	0.91 mM	0.0020 g	FW 110.04 g/l
D-glucosa	3.05 mM	0.0110 g	FW 180.20 g/l
Ca-lactato	2.92 mM	0.018 g	FW 308.30 g/l
FBS (Suero fetal bovino)	12%	2.4 ml	
pH 7.8	Filtrar		

---

<sup>a</sup> Comunicación personal (2004), protocolo de trabajo del Dr. Vilceu Bordignon.

## ANEXO 6

### MEDIO AMORTIGUADOR TRIS (TRIS BUFFERED MEDIUM: TBM) <sup>a</sup>

#### TRIS STOCK

REACTIVO	CONCENTRACIÓN		
Agua milipore		100 ml	
NaCl	113.1 mM	0.6610 g	FW 58.44 g/l
KCl	3.0 mM	0.0224 g	FW 74.55 g/l
Tris <sup>b</sup>	20.0 mM	0.3152 g	FW 157.6 g/l
D-glucosa	11.0 mM	0.1980 g	FW 180.2 g/l
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	7.5 mM	0.1103 g	FW 147.0 g/l

#### MEDIO AMORTIGUADOR TRIS

REACTIVO	CONCENTRACIÓN		
IVF Tris Stock		10 ml	
Na-piruvato	5.0 mM	0.0055 g	FW 110.04 g/l
Teofilina	2.5 mM	0.0045 g	FW 180.17 g/l
BSA (Albúmina sérica bovina) pH 7.4	0.1 mg ml <sup>-1</sup>	0.0100 g	
	Filtrar		

<sup>a</sup> Protocolo publicado por Berger y Horton, 1988.

<sup>b</sup> Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

ESTA TESIS NO SALI  
DE LA BIBLIOTECA

## ANEXO 7

### MEDIO DE CULTIVO DE EMBRIONES *IN VITRO*

#### MEDIO PARA CIGOTOS PORCINOS (PORCINE ZYGOTE MEDIUM: PZM-3) <sup>a</sup>

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
NaCl	108.00 mM
KCl	10.00 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.35 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.40 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25.07 mM
Na-piruvato	0.20 mM
Ca-(lactato) <sub>2</sub> ·5H <sub>2</sub> O	2.00 mM
L-Glutamina	1.00 mM
Hipotaurina	5.00
Medio Basal de aminoácidos (Basal Medium Eagle amino acids B6766) <sup>b</sup>	20.00 ml/l
Medio Mínimo Esencial con aminoácidos no esenciales (Minimum Essential Medium nonessential amino acids M7145) <sup>b</sup>	10.00 ml/l
Gentamicina	0.05 mg/ml
Albúmina Sérica Bovina (Fatty acid-free BSA)	3.00 mg/ml
Osmolaridad	288 ± 2 * mOsm
pH	7.3 ± 0.02

\* Media ± Desviación estándar

<sup>a</sup> Protocolo publicado por Yoshioka *et al.*, 2002.

<sup>b</sup> Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

## ANEXO 8

### COMPOSICIÓN DEL SUPLEMENTO EXPERIMENTAL: FORBOL 12-MIRIATATO 13-ACETATO (PMA)

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
PMA <sup>a</sup>	10 mM
TBM (Anexo 6)	5 $\mu$ l

---

<sup>a</sup> Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

## ANEXO 9

### Efecto de 0.1, 1 o 10 $\mu$ M de PMA a la hora 0, 3 y 5 post-inseminación en el estatus nuclear en ovocitos de IVF

Fecha	Tratamiento	#ovocitos	#M II	% MII	# Frag.	% Frag.	# Act.	% Act.	# 2 PN	% 2 PN	# +2PN	% +2PN	# Bloq.	% Bloq.
21-Oct-04	Testigo	13	2	15.4	0	0.0	1	7.7	6	46.2	4	30.8	0	0.0
	PMA 10,0'	22	2	9.1	0	0.0	0	0.0	9	40.9	9	40.9	2	9.1
	PMA 1,0'	23	2	8.7	0	0.0	0	0.0	4	17.4	17	73.9	0	0.0
	PMA 0.1,0'	25	0	0.0	0	0.0	1	4.0	11	44.0	13	52.0	0	0.0
04-Nov-04	Testigo	29	13	44.8	2	6.9	0	0.0	6	20.7	8	27.6	0	0.0
	PMA 10,0'	30	23	76.7	0	0.0	0	0.0	5	16.7	2	6.7	0	0.0
	PMA 1,0'	23	9	39.1	2	8.7	2	8.7	2	8.7	7	30.4	1	4.3
	PMA 0.1,0'	24	0	0.0	2	8.3	4	16.7	9	37.5	8	33.3	1	4.2
11-Nov-04	Testigo	36	3	8.3	0	0.0	4	11.1	10	27.8	19	52.8	0	0.0
	PMA 10,0'	5	0	0.0	2	40.0	1	20.0	0	0.0	1	20.0	1	20.0
	PMA 1,0'	28	3	10.7	0	0.0	1	3.6	2	7.1	19	67.9	3	10.7
	PMA 0.1,0'	26	2	7.7	0	0.0	0	0.0	2	7.7	22	84.6	0	0.0
02-Dic-04	Testigo	24	10	41.7	1	4.2	5	20.8	6	25.0	2	8.3	0	0.0
	PMA 10,3'	10	5	50.0	1	10.0	2	20.0	1	10.0	1	10.0	0	0.0
	PMA 1,3'	9	2	22.2	1	11.1	0	0.0	1	11.1	5	55.6	0	0.0
	PMA 0.1,3'	17	2	11.8	4	23.5	1	5.9	4	23.5	6	35.3	0	0.0
	PMA 10,5'	26	11	42.3	3	11.5	0	0.0	1	3.8	8	30.8	3	11.5
	PMA 1,5'	23	8	34.8	3	13.0	1	4.3	5	21.7	4	17.4	2	8.7
	PMA 0.1,5'	20	4	20.0	0	0.0	1	5.0	8	40.0	7	35.0	0	0.0

Tratamiento: substancia suplementada, concentración en  $\mu$ M, hora de administración post-inseminación

#ovocitos: Número de ovocitos en cada grupo

# M II: Número de ovocitos en metafase II

% M II: Porcentaje de ovocitos en metafase II

# Frag. : Número de ovocitos fragmentados

% Frag. : Porcentaje de ovocitos fragmentados

# Act. : Número de ovocitos activados por partenogénesis

% Act.: Porcentaje de ovocitos activados por partenogénesis

# 2 PN: Número de ovocitos con 2 pronúcleos

% 2 PN: Porcentaje de ovocitos con 2 pronúcleos

# +2PN: Número de ovocitos con más de 2 pronúcleos

% +2PN: Porcentaje de ovocitos con más de 2 pronúcleos

# Bloq. : Número de ovocitos con bloqueo espermático

% Bloq.: Porcentaje de ovocitos con bloqueo espermático

## ANEXO 10

**Efecto de 0.1, 1 o 10  $\mu\text{M}$  de PMA a la hora 0, 3 y 5 post-inseminación en el estatus nuclear en ovocitos de IVF polispermicos.**

Fecha	Tratamiento	# ovocitos	# +2PN	% +2PN	3 PN	% 3 PN	4 PN	% 4 PN	5 PN	% 5 PN	+ 5PN	% + 5PN
21-Oct-04	Testigo	13	4	30.8	3	75.0	1	25.0	0	0.0	0	0.0
	PMA 10,0'	22	9	40.9	4	44.4	0	0.0	4	44.4	1	11.1
	PMA 1,0'	23	17	73.9	13	76.5	4	23.5	0	0.0	0	0.0
	PMA 0.1,0'	25	13	52.0	8	61.5	3	23.1	2	15.4	0	0.0
04-Nov-04	Testigo	29	8	27.6	6	75.0	2	25.0	0	0.0	0	0.0
	PMA 10,0'	30	2	6.7	2	100.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	PMA 1,0'	23	7	30.4	4	57.1	3	42.9	0	0.0	0	0.0
	PMA 0.1,0'	24	8	33.3	3	37.5	5	62.5	0	0.0	0	0.0
11-Nov-04	Testigo	36	19	52.8	8	42.1	8	42.1	3	15.8	0	0.0
	PMA 10,0'	5	1	20.0	1	100.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	PMA 1,0'	28	19	67.9	6	31.6	4	21.1	2	10.5	7	36.8
	PMA 0.1,0'	26	22	84.6	5	22.7	5	22.7	5	22.7	7	31.8
02-Dic-04	Testigo	24	2	8.3	2	100.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	PMA 10,3'	10	1	10.0	1	100.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	PMA 1,3'	9	5	55.6	4	80.0	0	0.0	0	0.0	1	20.0
	PMA 0.1,3'	17	6	35.3	4	66.7	2	33.3	0	0.0	0	0.0
	PMA 10,5'	26	8	30.8	5	62.5	1	12.5	2	25.0	0	0.0
	PMA 1,5'	23	4	17.4	0	0.0	3	75.0	0	0.0	1	25.0
	PMA 0.1,5'	20	7	35.0	6	85.7	0	0.0	1	14.3	0	0.0

Tratamiento: substancia suplementada, concentración en  $\mu\text{M}$ , hora de administración post-inseminación

#ovocitos: Número de ovocitos en cada grupo

# +2PN: Número total de ovocitos con más de 2 pronúcleos

% +2PN: Porcentaje de ovocitos con más de 2 pronúcleos

# 3PN: Número de ovocitos con 3 pronúcleos

% 3PN: Porcentaje de ovocitos con 3 pronúcleos

# 4PN: Número de ovocitos con 4 pronúcleos

% 4PN: Porcentaje de ovocitos con 4 pronúcleos

# 5PN: Número de ovocitos con 5 pronúcleos

% 5PN: Porcentaje de ovocitos con 5 pronúcleos

# +5PN: Número de ovocitos con más de 5 pronúcleos

% +5PN: Porcentaje de ovocitos con más de 5 pronúcleos