



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ARGININA SOBRE EL DESARROLLO TEMPRANO DE EMBRIONES PORCINOS PRODUCIDOS *IN VITRO*

TESIS
PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
DAVID URBÁN DUARTE

ASESOR:
DR. HÉCTOR JIMÉNEZ SEVERIANO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN, UNAM

COMITÉ TUTORAL:
DR. DAVID ALEJANDRO CONTRERAS CARO DEL CASTILLO
CENTRO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN EN PRODUCCIÓN
ANIMAL EN ALTIPLANO, UNAM
DR. JOSÉ FERNANDO DE LA TORRE SÁNCHEZ
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE
LA SALUD ANIMAL

MÉXICO, D.F. ENERO, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIAS

A mis padres quienes me apoyaron y estuvieron a mi lado en todo momento.

A mis hermanos por darme ánimos y apoyarme siempre.

A mi novia Ale quien siempre estuvo a mi lado.

A mis abuelos que siempre me apoyan desde el cielo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a mi director de Tesis el **Dr. Héctor Jiménez Severiano**, por confiar en mí desde el primer momento, por su apoyo, orientación y dirección durante la elaboración de esta tesis, y sobre todo gracias por corregir mis errores, por sus consejos y por siempre estar al pendiente de mi formación.

De la misma manera, quiero destacar la labor del **Dr. José Fernando de la Torre Sánchez**, co-director de Tesis, por su apoyo, su disposición, sus consejos y su gran sentido del humor, gracias permitirme formar parte de su equipo de trabajo, el cual fue una parte muy importante de mi formación, gracias por confiar en mí.

También quiero destacar la labor del **Dr. David Alejandro Contreras Caro del Castillo**, co-director de Tesis, por todo el apoyo brindado durante mi formación, por su capacidad de lucha constante y sus buenos consejos, por colaborar en gran medida en mi formación, gracias por siempre estar dispuesto y al pendiente de este proyecto.

Al **M.C. Horacio Álvarez**, por ser un ejemplo de lucha y superación, por estar siempre dispuesto a enseñarme y brindarme la ayuda necesaria, por tu amistad, tus buenos consejos y por dejarme formar parte de tu equipo.

A la **Ing. Sandra Pérez**, por tu apoyo y paciencia a la hora de trabajar en mis inicios, por siempre estar dispuesta a ayudarme y brindarme tu amistad, gracias por todo lo aprendido.

A mis amigos de Maestría **Yair Anahí y Fernando**, por todo el apoyo que me brindaron, por sus consejos y por todos los buenos momentos vividos durante este tiempo.

Al **Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP**, por abrirme sus puertas y permitirme realizar mi trabajo en sus instalaciones, por todo el apoyo brindado de todos y cada uno de sus departamentos y sobre todo gracias al laboratorio de Acuático-Pecuario y su grupo, por dejarme formar parte de y por todo el conocimiento brindado durante mi formación.

A la empresa **Pigamex y GENA agropecuaria**, por permitirme disponer del material biológico y por su excelente disposición a ofrecerme su ayuda siempre que fue necesario.

Al **CONACYT** por becarne durante la elaboración de esta Tesis.

Al **COMECYT** por su apoyo.

A **mi familia**, por ser pieza clave durante este proceso y porque todo lo que soy se lo debo a ellos.

A mi novia **Ale** por su paciencia, su espera, su apoyo y ánimo que siempre me brindo. Gracias de corazón por siempre estar a mi lado.

ÍNDICE

DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1 Maduración de ovocitos <i>in vivo</i>	3
2.1.1 Maduración nuclear.....	3
2.1.2 Maduración citoplasmática	4
2.2 Fertilización de ovocitos <i>in vivo</i>	6
2.2.1 Capacitación espermática	7
2.2.2 Penetración de la zona pelúcida y fusión de membranas	8
2.2.3 Reacción acrosomal	9
2.2.4 Activación del ovocito	10
2.2.5 Prevención de la poliespermia <i>in vivo</i>	11
2.3 Desarrollo embrionario	
2.3.1 División embrionaria.....	12
2.3.2 Formación del blastocisto	13
2.3.4 Eclosión.....	13
2.4 Maduración de ovocitos <i>in vitro</i>	14
2.4.1 Condiciones de cocultivo	15
2.4.2 Medios de cultivo.....	15
2.4.3 Factores que influyen en la IVM.....	16
2.4.4 Clasificación de ovocitos	18

2.5 Fertilización de ovocitos <i>in vitro</i>	18
2.5.1 Condiciones de cocultivo	18
2.5.2 Medios de cultivo	19
2.5.3 Prevención de la poliespermia <i>in vitro</i>	19
2.6 Cultivo de embriones	
2.6.1 Condiciones del cultivo	21
2.6.2 Medios de cultivo	21
2.7 Arginina	21
2.7.1 Efecto de la arginina sobre la reproducción	24
2.7.2 Óxido nítrico	25
2.7.2.1 Efecto sobre el desarrollo folicular	27
2.7.2.2 Efecto sobre la maduración del ovocito	27
2.7.2.3 Efecto sobre la fertilización	28
2.7.2.4 Efecto sobre el desarrollo embrionario	29
2.7.3 Poliamidas	30
2.7.3.1 Efecto sobre el desarrollo folicular	31
2.7.3.2 Efecto sobre la maduración del ovocito	32
2.7.3.3 Efecto sobre la fertilización	32
2.7.3.4 Efecto sobre el desarrollo embrionario	33
3. HIPÓTESIS	34
4. OBJETIVOS	34
4.1 Objetivos específicos	34
5. METODOLOGÍA	35
5.1 Medios de cultivo	35
5.2 Obtención y transporte de los ovarios	38
5.3 Obtención y selección de los ovocitos	38
5.4 Maduración <i>in vitro</i>	38
5.5 Fertilización <i>in vitro</i>	39
5.6 Cultivo embrionario	39
5.7 Valoración microscópica de los ovocitos y embriones	40

5.8 Diseño de los experimentos	41
5.9 Análisis estadístico	44
6. RESULTADOS	45
6.1 Experimento 1	45
6.2 Experimento 2	45
6.3 Experimento 3	47
6.4 Experimento 4	47
7. DISCUSIÓN	50
8. CONCLUSIONES	56
9. LITERATURA CITADA	57
ANEXO No. 1 Congelación de semen de cerdo	74

RESUMEN

Recientemente, se ha mostrado que la arginina puede influir en varios aspectos de la función reproductiva. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la arginina durante los procesos de maduración de ovocitos y el desarrollo temprano de embriones porcinos producidos *in vitro*. Los ovocitos se obtuvieron de cerdas prepúberes. Se realizaron cuatro experimentos: Experimento 1. Los complejos cúmulus-ovocito fueron cultivados en medio de maduración North Carolina State University (NCSU-23) sin Albumina Sérica Bovina (BSA), adicionado con o sin arginina. Experimento 2. Los complejos cúmulus-ovocito fueron cultivados en medio de maduración, como se describió en el experimento 1; los ovocitos maduros fueron fertilizados y los presuntos cigotos fueron transferidos a medio de cultivo embrionario NCSU-23 sin BSA, adicionado con o sin arginina, en donde permanecieron cultivados 168 horas. Experimento 3. Los complejos cúmulus-ovocito fueron cultivados en medio de maduración NCSU-23 con BSA, adicionado con y sin arginina. Experimento 4. Los complejos cúmulus-ovocito fueron cultivados en medio de maduración, como se describió en el experimento 3; los ovocitos maduros fueron fertilizados y los presuntos cigotos fueron transferidos a medio de cultivo embrionario NCSU-23 con BSA, adicionado con o sin arginina, en donde permanecieron cultivados 168 horas. En los experimentos 1 y 3 se evaluaron las siguientes variables de respuesta: porcentaje de ovocitos maduros e inmaduros; en los experimentos 2 y 4 se evaluaron las siguientes variables de respuesta: porcentaje de embriones divididos, de mórulas y de blastocistos. Se observó un mayor porcentaje ($P < 0.05$) de ovocitos maduros cuando se administró arginina en los medios con y sin BSA. Hubo un incremento en los porcentajes de división embrionaria, embriones de más de 6 células y mórulas cuando se administró arginina en el medio de cultivo embrionario sin BSA. En conclusión, la adición de arginina tuvo efectos favorables sobre la maduración de ovocitos y el desarrollo *in vitro* de embriones porcinos.

ABSTRACT

Recently it has been shown that arginine can influence many aspects of reproductive function. The aim of this study was to determine the effect of arginine during oocyte maturation and early development of porcine embryos produced *in vitro*. Oocytes were obtained from pre-pubertal gilts. Experiment 1. The cumulus-oocyte complexes were matured in North Carolina State University (NCSU-23) medium without Bovine Serum Albumin (BSA) added with or without arginine, four experiments were performed. Experiment 2. The cumulus-oocyte complexes were cultured on maturation medium, as described in experiment 1; mature oocytes were fertilized and the presumptive zygotes were transferred to embryo culture medium NCSU-23 without BSA, added with or without arginine, they were cultured for 168 hours. Experiment 3. The cumulus-oocyte complexes were cultured on maturation medium NCSU-23 with BSA added with and without arginine. Experiment 4. The cumulus-oocyte complexes were cultured on maturation medium, as described in Experiment 3; mature oocytes were fertilized and the presumptive zygotes were transferred to embryo culture medium NCSU-23 with BSA, added with or without arginine, they were cultured for 168 hours. In experiments 1 and 3 the following response variables were evaluated: percentage of mature and immature oocytes; in experiments 2 and 4 the following response variables were evaluated: percentage divided embryos, morulas and blastocysts. A higher percentage ($P < 0.05$) was observed of mature oocytes when arginine was administered in medium with and without BSA. There was an increase in the percentages of embryo divided, 6 cell or more embryo and morulas when arginine was administered in the embryo culture medium without BSA. In conclusion, the addition of arginine had favorable effects on oocyte maturation and *in vitro* embryo development of porcine.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición del medio de recuperación de ovocitos Tyrode modificado.....	46
Cuadro 2. Composición del medio NCSU-23 para la maduración de ovocitos y el cultivo embrionario	48
Cuadro 3. Composición del medio TBM para la IVF.....	48
Cuadro 4. Efecto de la suplementación con arginina en medios sin BSA sobre el desarrollo embrionario temprano	56
Cuadro 5. Efecto de la suplementación con arginina en medio de maduración y medio de cultivo embrionario sin BSA sobre el desarrollo embrionario temprano	56
Cuadro 6. Efecto de la suplementación con arginina en medios con BSA sobre el desarrollo embrionario temprano	58
Cuadro 7. Efecto de la suplementación con arginina en medio de maduración y medio de cultivo embrionario sin BSA sobre el desarrollo embrionario temprano	58
Cuadro 8. Composición del diluyente para congelación de semen de cerdo.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fuentes y destino metabólicos de la arginina	31
Figura 2. Tratamientos del experimento 2	52
Figura 3. Tratamientos del experimento 4	53
Figura 4. Efecto de la suplementación con arginina en el medio sin BSA sobre el porcentaje de maduración de ovocitos <i>in vitro</i>	55
Figura 5. Efecto de la suplementación con arginina en el medio con BSA sobre el porcentaje de maduración de ovocitos <i>in vitro</i>	57

ABREVIATURAS

Arg (-)	Tratamiento sin arginina
Arg (+)	Tratamiento con arginina
Arg (+/+)	Tratamiento con arginina en el medio de maduración y cultivo embrionario
Arg (-/+)	Tratamiento sin arginina en el medio de maduración y con arginina en el medio de cultivo embrionario
Arg (-/-)	Tratamiento sin arginina en el medio de maduración y cultivo embrionario
Arg (+/-)	Tratamiento con arginina en el medio de maduración y sin arginina en el medio de cultivo embrionario
BSA	Albúmina sérica bovina
COCs	Complejos cúmulus-ovocitos
eCG	Gonadotropina coriónica equina
EGF	Factor de crecimiento epidermal
eNOS	Óxido nítrico sintetasa endotelial
FSH	Hormona folículo estimulante
hCG	Gonadotropina coriónica humana
iNOS	Óxido nítrico inducible
IVF	Fertilización <i>in vitro</i>
IVM	Maduración <i>in vitro</i>
LH	Hormona luteinizante
MAPK	Proteína cinasa activadora de mitógeno
NADPH	Nicotidamina adenina dinucleótido de fosfato
NCSU	North Carolina State University
nNOS	Óxido nítrico sintetasa neuronal
NOS	Óxido nítrico sintetasa
OCD1	Ornitina descarboxilasa

ONOO⁻	Peroxinitrato
TALPm	Tyrodes, albúmina, lactato y piruvato modificado
TBM	Tris-buffer modificado
TCM 199	Medio de cultivo de tejidos 199

1. INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* de embriones porcinos ha sido particularmente atractiva para los investigadores por muchos años (Wheeler et al., 2004), sin dejar de lado el grado de complejidad que esto conlleva. La disponibilidad de un gran número de ovocitos madurados y embriones a través de técnicas de maduración *in vitro* (IVM), fertilización *in vitro* (IVF) y cultivo de embriones *in vitro* es crucial para los procesos biomédicos y biotecnologías reproductivas (Gil et al., 2010). Sin embargo, la producción exitosa de embriones porcinos *in vitro* es llevada a cabo con muchas dificultades. Algunas de estas dificultades son: la pobre capacidad de desarrollo de los embriones producidos *in vitro* y las condiciones subóptimas del cultivo de embriones (Abeydeera, 2002), mostrando que el rendimiento de estas técnicas es todavía inapropiado en la obtención de embriones suficientes para los procesos anteriormente mencionados.

Durante los últimos años, distintos grupos de investigación se han centrado en el perfeccionamiento de estas técnicas con el fin de elevar el número de embriones viables obtenidos *in vitro*. Con el empleo de medios de maduración químicamente definidos podemos mejorar los resultados de estas técnicas, ya que se sustituyen materiales biológicos como el fluido folicular porcino o sueros y fluido. Estos fluidos o secreciones biológicas así como la albúmina sérica bovina (BSA), contienen cantidades de proteína y aminoácidos desconocidos que pueden variar de un experimento a otro, por lo que estudios sobre los efectos que tienen los diversos factores contenidos en los materiales biológicos pueden ayudar a la formulación de mejores medios químicamente definidos (Abeydeera, 2002).

Recientemente, se ha reportado que la arginina puede modular varios aspectos de la función reproductiva a través de sus metabolitos, entre los que se encuentran el óxido nítrico y las poliaminas (Sooranna et al. 1995; Bu et al., 2003; Zhao et al., 2008). Se ha demostrado que el óxido nítrico suministra información intra e intercelular y su función en los ovarios de mamíferos ha sido extensamente estudiada (Knowels y Mocada, 1994). Las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) juegan un papel crucial en la regulación de la expresión de genes, la traducción de señales, la función de los canales iónicos, la

síntesis de proteínas y ácido desoxirribonucleico (DNA), así como la diferenciación y proliferación celular (Childs et al., 2003; Fleidervish et al., 2008; Sarka et al., 2009). Adicionalmente, se han sugerido efectos de la arginina a través de sus metabolitos sobre la maduración de los ovocitos en roedores y cerdos (Bu et al., 2003; Hattori et al., 2001).

Debido a esto, es posible que los efectos favorables de la arginina que se han observado sobre la sobrevivencia embrionaria y el desarrollo fetal en cerdos puedan originarse en etapas muy tempranas, actuando en forma sinérgica sobre la maduración final de los ovocitos y sobre el desarrollo embrionario temprano.

Por lo anterior, se determinó que es de gran importancia generar información que beneficie la estandarización de la técnica de maduración, fertilización y desarrollo temprano de embriones porcinos *in vitro*. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la arginina sobre la maduración de ovocitos y el desarrollo temprano de embriones porcinos producidos *in vitro*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Maduración de ovocitos *in vivo*

La maduración del ovocito es un proceso complejo bien regulado que involucra cambios nucleares y citoplasmáticos (De los Reyes et al., 2011). Aunque son procesos distintos, la maduración nuclear y citoplasmática son eventos inter-ligados que ocurren simultáneamente en determinados tiempos, aunque la programación molecular del citoplasma quizá comience durante la fase de crecimiento del ovocito (Ferreira et al., 2009).

2.1.1 Maduración nuclear

La maduración nuclear se refiere a la reanudación de la meiosis, el rompimiento de la vesícula germinal, el paso a la metafase I, la anafase I, la telofase I y la continuación de la adquisición meiótica hasta la detención en la metafase II. Con la reanudación de la meiosis comienza la maduración nuclear del ovocito. En los vertebrados los ovocitos son detenidos en el estadio de diploteno de la profase de la primera división meiótica. Sólo los ovocitos con un completo crecimiento pueden reanudar la meiosis en respuesta a la estimulación de gonadotropinas. Los ovocitos continúan a través de la primera división meiótica y son detenidos en el estadio de metafase de la segunda división meiótica hasta la fertilización (Marteil et al., 2009), esta maduración nuclear puede ser evaluada de manera no invasiva observando en un microscopio óptico la formación del primer cuerpo polar del ovocito (Krisher, 2013).

La maduración nuclear juega un papel central en la calidad de los ovocitos, pero la reanudación de la meiosis puede tener lugar espontáneamente en cultivo sin necesidad de lograr la competencia para el desarrollo embrionario (Rozinek et al., 1995). Sin embargo, el proceso meiótico involucra cambios mayores dentro del citoplasma que son esenciales para el proceso de maduración del ovocito (Brevini et al., 2007).

Durante la maduración del ovocito, la actividad de la proteína cinasa activadora de mitógeno (MAPK) es esencial para la reanudación de la meiosis, organización de

microtúbulos y el arresto en metafase II (Sun et al., 1999). Investigaciones más detalladas mostraron que la restauración meiótica es inducida por gonadotropinas, con participación de la MAPK que es activada en las células del cúmulus, no en ovocitos por si mismos (Ohashi et al. 2003).

2.1.2 Maduración citoplasmática

El ovocito es un complejo celular dentro del cual los organelos tienen que mantener una relación espacial específica (Cran, 1985). En varias especies se ha demostrado que el reordenamiento estructural más importante del citoplasma se lleva a cabo durante la maduración (Brevini et al., 2007). Múltiples facetas de la maduración citoplasmática han sido sugeridas, incluyendo el metabolismo de carbohidratos y lípidos, la función y localización mitocondrial, la reducción de radicales libres y la comunicación con las células del cúmulus (Krisher, 2013).

Los procesos de maduración citoplasmática pueden ser divididos en tres principales eventos: la redistribución de los organelos citoplasmáticos, la dinámica de los microfilamentos y microtúbulos del citoesqueleto y la maduración molecular (Ferreira et al., 2009).

Redistribución de los organelos citoplasmáticos

Es bien establecido que varios cambios ultra estructurales pueden ser observados con respecto a la morfología y redistribución de los organelos citoplasmáticos durante la maduración del ovocito. La movilización de los organelos citoplasmáticos durante la maduración ocurre a través de acciones de los microfilamentos del citoesqueleto y los microtúbulos. El reacomodo de los organelos depende de la necesidad de la célula durante cada estadio del desarrollo (Ferreira et al., 2009). Uno de los organelos que participa en esta redistribución son las mitocondrias y juegan un papel extremadamente importante ya que son componentes claves de la maquinaria metabólica responsable de proveer la energía que es consumida durante los procesos de maduración y desarrollo embrionario (Krisher y

Bavister, 1998; Stojkovic et al., 2001), ya que producen la mayoría del trifosfato ATP por fosforilación oxidativa (Hao et al., 2009). La actividad y organización de las mitocondrias son necesarias para diversos eventos involucrados en la maduración citoplasmática (Van Blerkom y Runner, 1984).

La síntesis de proteínas es indispensable no sólo para la maduración del ovocito, también para la formación del cigoto y la embriogénesis temprana. Con este fin, una apropiada cantidad de ribosomas deben estar presentes durante la maduración. Durante la metafase I en bovinos, la síntesis de proteína en el ovocito es aproximadamente tres veces más grande que durante el estadio de rompimiento de la vesícula germinal. Cuando las células alcanzan la metafase II, los ovocitos exhiben niveles basales de traducción de RNAm (Tomek et al., 2002).

Durante la maduración ocurren cambios bioquímicos y estructurales de importancia en el retículo endoplásmico liso, para el correcto funcionamiento de la regulación del calcio intracelular (Ferreira et al., 2009) y de los gránulos corticales que serán distribuidos a través de la cerrada superficie interior de la membrana plasmática del ovocito (Thibault et al., 1987) para participar en el mecanismo de bloqueo a la poliespermia (Wessel et al., 2001).

Dinámica de los filamentos del citoesqueleto

La redistribución de los organelos a las diferentes áreas de la célula es mediada por la red de microtúbulos (Van Blerkom, 1991). Los microtúbulos son polímeros de α y β -tubulinas y representan los componentes dinámicos del citoesqueleto que ejercen un papel clave en diversas funciones, están involucrados en el mantenimiento de la forma de la célula, permitiendo el movimiento y transporte de moléculas y organelos. Además representan un andamiaje dinámico para la replicación celular y formación del huso mitótico (Brevini et al., 2007).

Es posible que la ausencia u oportuna formación de la red de microtúbulos en el citoplasma de ovocitos defectuosos conlleve a una incompleta maduración nuclear y citoplasmática. Una correcta organización de la red de microtúbulos del citoplasma, una

adecuada distribución de energía y una específica localización RNA, son factores cruciales para modular la competencia de desarrollo de ovocitos porcinos (Brevini et al., 2007).

Maduración molecular

La maduración molecular corresponde a las fases de crecimiento y maduración del ovocito e involucra la transcripción, el almacenamiento y el procesamiento de mRNAs expresados por los cromosomas, los cuales son traducidos a proteínas por los ribosomas (Ferreira et al., 2009). Las proteínas derivadas de estos RNAm están involucradas en la maduración y en subsecuentes eventos celulares tales como la fertilización, la formación de pronúcleos y el desarrollo embrionario temprano. Por lo tanto, estas proteínas son almacenadas el tiempo necesario hasta su utilización (Sirard, 2001).

Dado que muchos RNAm son utilizados hasta la activación del genoma embrionario, el correcto almacenamiento en el citoplasma del ovocito es de gran importancia. Después de la reanudación de la meiosis, no hay una gran expresión de los genes (Sirard, 2001), por lo tanto lo que fue producido durante la fase de crecimiento será metabolizado en el tiempo apropiado (Ferreira et al., 2009).

El RNAm transcrito durante la maduración molecular del ovocito es acumulado de manera estable, pero transitoriamente inactivado (Sirard, 2001; Tomek, 2002). El RNAm acumulado es protegido de la degradación nucleolítica y permanecen guardados hasta que las señales para traducción son generadas durante la maduración y el desarrollo embrionario temprano (Fulka-Jr et al., 1998).

2.2 Fertilización de ovocitos *in vivo*

La fertilización es el proceso por el cual el ovocito y el espermatozoide, con dotación cromosómica haploide (n) van a interactuar, unirse y activarse mutuamente para dar lugar a un cigoto con dotación cromosómica diploide (2n). La fertilización de los ovocitos porcinos tiene lugar unas pocas horas después de la ovulación, en la unión ampular ístmica del oviducto (Hunter, 1991).

2.2.1 Capacitación espermática

La capacitación espermática es un término colectivo dado al cambio que sufren los espermatozoides cuando están en contacto con el tracto reproductivo femenino (Rathi et al., 2001). Estos cambios incluyen la reorganización de las proteínas, el metabolismo de los fosfolípidos y la reducción de los niveles de colesterol en la membrana (Yanagimachi, 1994). La capacitación involucra cambios en la motilidad espermática, conocido como hiperactivación (Yanagimachi, 1994), esto provee el empuje necesario para la penetración en la zona pelúcida (Rathi et al., 2001). En el cerdo, el espermatozoide necesita entre 5 y 6 horas en el interior del tracto genital femenino para adquirir la capacidad de penetrar al ovocito (Polge, 1978).

La capacitación y la subsecuente reacción acrosomal son eventos importantes en el proceso de fertilización; ellos son esenciales para activar las habilidades espermáticas de unión y penetración a la zona pelúcida para posteriormente fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (Yanagimachi, 1994).

Hiperactivación espermática

La hiperactivación es definida como el patrón de movimiento mostrado por la mayoría de los espermatozoides recuperados de la ampulla del oviducto en la fertilización (Yanagimachi, 1994) y muestra la habilidad de los espermatozoides para detectar la pared del oviducto, para penetrar la mucosa y finalmente penetrar la zona pelúcida del ovocito. El movimiento de hiperactivación de los espermatozoides se aprecia diferente dentro de las condiciones físicas y en las diferentes especies, pero básicamente conlleva un incremento de la amplitud de curva del flagelo y asimetría (Ho y Suarez, 2001). Hay evidencia de que la fuente de la señal es el fluido folicular (Yao et al., 2000). Las células de cúmulus dentro del ampulla junto con el ovocito proveen señales para la hiperactivación (Fetterolf et al., 1994) Aunque la traducción de la señal que regula la cascada de la hiperactivación no puede ser descrita completamente, es claro que los iones de calcio interactúan en el

axonema del flagelo como interruptor sobre la hiperactivación (Yanagimachi, 1994; Ho y Suarez, 2001) y dan soporte a la movilidad.

El colesterol y el sulfato de colesterol de la membrana de los espermatozoides limitan la permeabilidad iónica de la misma, la inserción y la movilidad de las proteínas dentro de la bicapa lipídica brindan una mayor rigidez y estabilización de la membrana (Suzuki y Yanagimachi, 1989). Durante el proceso de la capacitación, los componentes de la superficie espermática son modificados o eliminados por secreciones del aparato reproductor femenino, entre ellos la desulfatación del colesterol, lo que desestabiliza la bicapa fosfolipídica y permite la reacción acrosomal.

2.2.2 Reacción acrosomal

En los mamíferos, los espermatozoides deben experimentar la reacción acrosomal para atravesar la zona pelúcida del ovocito (Yanagimachi, 1994). El acrosoma es un gránulo de gran tamaño que contiene enzimas en forma de zimógeno, fundamentalmente hialuronidasa, y que se encuentran situadas en la región apical de la cabeza del espermatozoide, bajo su membrana plasmática (Martínez, 2002). La reacción acrosomal es un proceso de exocitosis irreversible que conlleva la liberación de enzimas hidrolíticas y permiten que el espermatozoide penetre la zona pelúcida (Witte y Shanfer-Somi, 2007).

Una vez que el espermatozoide reconoce y se une a su ligando en la zona pelúcida, da lugar a la salida de colesterol, la aparición de zonas de alta fluidez pobres en proteínas en la membrana plasmática y a una serie de cambios en la permeabilidad iónica de la misma, ocasionando un aumento del calcio, del AMPc y del pH intracelular. Esta alcalinización del citoplasma del espermatozoide provoca la apertura de los canales de Ca^{+2} y por tanto, la entrada masiva de este catión (Töpfer-Petersen et al., 2000) que será esencial para el inicio de la reacción acrosomal.

Al fusionarse la membrana acrosomal y plasmática del espermatozoide, se originan unas vesículas que se desprenden de la cabeza espermática y, de este modo, se provoca la liberación y dispersión del contenido del acrosoma (Martínez, 2002).

2.2.3 Penetración de la zona pelúcida y fusión de gametos

La zona pelúcida es una matriz extracelular que envuelve al ovocito, protegiendo su desarrollo y durante la preimplantación embrionaria contra daños físicos. Los espermatozoides que son incapaces de reconocer y unirse a las glicoproteínas de la zona pelúcida, así como aquellos incapaces de someterse a una reacción acrosomal, fallan en la fertilización del ovocito. Los espermatozoides son almacenados en la unión utero-tubárica en condiciones que los mantienen viables y en proceso de capacitación, esto permite a los espermatozoides interactuar con el ovocito de una manera apropiada. Una vez que el espermatozoide alcanza el sitio de la fertilización reconoce al ovocito por interacciones con glicoproteínas (Töpfer-Petersen et al., 2000), estas glicoproteínas en mamíferos se encuentran en la zona pelúcida y son tres glicoproteínas producto de tres genes llamados de acuerdo a su longitud: los genes ZP2, ZP1 y ZP3 (Harris et al., 1994). Durante la interacción de los espermatozoides con las glicoproteínas de los ovocitos existen dos tipos de uniones, la primaria y la secundaria. En la unión primaria el espermatozoide se une a la zona pelúcida, previo a la reacción acrosomal, está involucrada la glicoproteína espermática ZP3; mientras que en la secundaria, que se lleva a cabo después de la reacción acrosomal, interviene la glicoproteína ZP2 (Myles y Primakoff, 1997). Al parecer el papel que desempeña la ZP1 es solamente estructural (Kopf, 1999). La unión del espermatozoide con la ZP3 induce la exocitosis del acrosoma a través de dos vías de señal-activación. La primera produce la activación de GTP y de la fosfolipasa C. De esta manera, se produce una elevación del calcio citoplasmático del espermatozoide (García, 2005). La segunda vía, estimulada también por el mismo receptor, incrementa el flujo de calcio a través de los canales tipo T (Primakoff y Myles, 2002). La unión secundaria acontece tras la reacción acrosomal. El espermatozoide reaccionado permanece unido a la ZP2 gracias a la enzima proacrosina que se encuentra anclada a la membrana acrosomal interna. Los espermatozoides que hayan sufrido la reacción acrosomal previo a la unión con las glicoproteínas de la zona pelúcida, no fecundarán al ovocito (Töpfer-Petersen et al., 2000).

Tras la reacción acrosomal y la unión secundaria en la zona pelúcida, el espermatozoide atraviesa el espesor de la zona pelúcida para alcanzar el espacio

perivitelino. Según hipótesis propuestas, la penetración de la zona pelúcida se conseguiría mediante la acción coordinada de las enzimas acrosomales liberadas en la reacción acrosomal y a la potente fuerza de empuje desarrollada por el movimiento del espermatozoide, que agita la cola de lado a lado y la cabeza de delante a atrás (Martínez, 2002). Una vez en el espacio perivitelino, la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide localizada sobre el segmento ecuatorial se une a la membrana plasmática del ovocito, y se inicia en ese punto la fusión de ambas membranas (Moore y Bedford, 1983). En el proceso de fusión están implicadas unas proteínas presentes en la membrana plasmática del espermatozoide, la fertilina y ciritestina (Primakoff y Myles, 2002). La entrada de la cabeza del espermatozoide en el citoplasma del ovocito va acompañada de la incorporación gradual de su cola. Las mitocondrias presentes en la cola del espermatozoide son degradadas y sólo las mitocondrias maternas pasarán a la siguiente generación (Yanagimachi, 1994).

2.2.4 Activación del ovocito

La fusión de las membranas de ambos gametos desencadena la activación del ovocito mediante una cascada de señales de transducción que darán lugar al cigoto diploide. La activación se puede definir como una serie de cambios celulares que son inducidos por el espermatozoide en el ovocito y producen la reanudación de la meiosis, y la posterior transformación del ovocito en un embrión capaz de desarrollarse (Ben-Yosef y Shalgi, 2001).

La fusión de las membranas del espermatozoide y del ovocito provoca una liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracitoplasmáticos (como el retículo endoplásmico liso), que da lugar a un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} en el ovocito penetrado en forma de oscilaciones repetitivas. El incremento en la concentración de calcio intracelular ocurre entre los tres primeros minutos de la fusión de las membranas y se presenta como en oleadas desde la entrada espermática (Ben-Yosef y Shalgi, 2001). La primera entrada de calcio es seguida por una serie de entradas cortas de elevada amplitud que se denominan oscilaciones de calcio. Éstas se observan en todos los ovocitos de mamíferos pero su

frecuencia es específica de especie. Conforme avanza el proceso de fertilización, la amplitud y la frecuencia de los influxos de calcio disminuyen mientras que la duración se incrementa hasta que se produce el cese total de las oscilaciones, que tiene lugar durante la interfase y la formación pronuclear (varias horas después de la entrada del espermatozoide) (García, 2005).

En los ovocitos de mamíferos no es absolutamente necesaria la penetración espermática para experimentar su activación, ya que también pueden ser activados por una gran variedad de estímulos físicos y químicos (Whittingham, 1980).

Cuando los pronúcleos masculino y femenino están completamente formados, migran hacia el centro del citoplasma, se aproximan el uno al otro hasta quedar frente a frente, las membranas nucleares se desintegran y sus cromosomas se asocian antes de efectuar la primera división mitótica (Martínez, 2002). La unión de los pronúcleos masculino y femenino se considera el final del proceso de la fertilización y el principio del desarrollo embrionario, a esta unión se le denomina singamia (Yanagimachi, 1994).

2.2.5 Prevención de la poliespermia *in vivo*

Existen varios mecanismos de defensa que evitan la poliespermia. Uno de ellos es el descenso importante en el número de espermatozoides que son depositados en la hembra y los que finalmente llegan al lugar de la fertilización. Los espermatozoides que no consiguen alcanzar su objetivo quedan retenidos tanto en su trayecto a lo largo del útero, como en los reservorios de la unión ampular ístmica. En los reservorios, los espermatozoides viables son liberados de una manera gradual y en un número reducido momentos antes de la ovulación. Otros mecanismos son las capas de células del cúmulus que rodean al ovocito al ser ovulado y el establecimiento de la reacción cortical en la zona pelúcida, que es el mecanismo más específico de bloqueo de la poliespermia (Martínez, 2002).

La reacción cortical, con la exocitosis del contenido de los gránulos corticales, es el principal mecanismo que dispone el ovocito porcino para evitar la entrada en su citoplasma de más de un espermatozoide. Al final de la maduración de los ovocitos, se produce la migración de los gránulos corticales hacia la membrana plasmática. Durante la fertilización,

la penetración del espermatozoide induce la exocitosis de los gránulos corticales, que contienen enzimas hidrolíticas y componentes sacáridos, cuyo contenido se dispersa en el espacio perivitelino y produce la formación de una especie de cubierta cortical granular, así como modificaciones en las proteínas de la zona pelúcida y la inactivación de los receptores espermáticos, bloqueando así la penetración de más de un espermatozoide. Sin embargo, la reacción zonal no es suficiente cuando los ovocitos se exponen a un número de espermatozoides superior al fisiológico. Efectivamente, se ha observado que los ovocitos madurados *in vivo* y fertilizados *in vitro* pueden alcanzar niveles de hasta un 100% de poliespermia (Gil, 2001).

2.3 Desarrollo embrionario

2.3.1 División embrionaria

Poco después de la fertilización, el cigoto comienza a dividirse a la vez que va recorriendo el oviducto hacia el útero, esto último facilitado por la acción de las hormonas estrogénicas (García, 2005).

Los cigotos porcinos sufren la primera división celular aproximadamente entre las 17 y 19 h después de la ovulación (Hunter, 1974). Los embriones porcinos se mantienen en el estadio de 2 células durante 6 a 8 h mientras que el estadio de 4 células se prolonga durante 20 a 24 h (Flint, 1981), por lo que la mayoría de los embriones entran en este estadio en el útero (Davis, 1985). Durante este proceso, la división se produce sin que aumente la masa celular, a diferencia de la mitosis de las células somáticas (García, 2005). El estadio de mórula (8 a 16 células) en la especie porcina se alcanza alrededor del día 4, tomando como día 0 el momento de la ovulación (Stroband y Van der Lende, 1990).

La activación del genoma embrionario, es el punto a partir del cual el genoma embrionario comienza a ser transcripcionalmente activo y pasa a ser el que controla el desarrollo embrionario; antes de esta activación genómica, el desarrollo embrionario está controlado por las proteínas y el RNAm maternos, los cuales son sintetizados y almacenados en forma inactiva por el ovocito (Exley y Carol, 1999). El bloqueo en el

estadio de 4 células, que supone un obstáculo para el cultivo *in vitro*, corresponde al momento de la activación del genoma embrionario, y es análogo al que sufren los embriones ovinos de 8 a 16 células o los bovinos en 8 células (Martínez, 2002).

2.3.2 Formación del blastocisto

Cuando la mórula está formada, los blastómeros empiezan a separarse en 2 poblaciones distintas: las células internas y las externas. Las células de la posición interna desarrollan uniones tipo *gap*, que por un lado permiten la comunicación intercelular y, por otro, van a mantener agrupado a este conjunto celular. Las células externas van a desarrollar uniones estrechas u ocluyentes, que se producen para modificar las características de permeabilidad. Este estadio en el que el embrión aún se encuentra rodeado por la zona pelúcida, recibe el nombre de blastocisto que se produce al día 5 o 6, en este tiempo el genoma embrionario es activado por completo, además se diferencian según su posición dos poblaciones de células: una interna (masa celular interna) que dará origen al embrión propiamente dicho, y otra, la situada periféricamente, que origina el trofoectodermo o trofoblasto, que interviene en la ingestión selectiva de nutrientes y formará posteriormente el corion. Las células del trofoblasto tienen permeabilidad selectiva, lo cual favorece el transporte de agua y sodio que contribuye a la formación del blastocele (García, 2005; Ajduk y Zernicka-Goetz, 2013). El número de células en el momento de la formación del blastocele es normalmente de 16 a 32 (Papaioannou y Ebert, 1988).

2.3.3 Eclosión

Antes de la eclosión, los blastocistos sufren un fenómeno de expansión ocupando la totalidad del espacio perivitelino, esta es la etapa de blastocisto expandido. La media de células en los blastocistos porcinos expandidos es de 65 a 120 (Papaioannou y Ebert, 1988). Entre el día 6 y 7 se produce la rotura de la zona pelúcida y la salida del embrión por el punto de rotura. Entre las causas de rotura se encuentran el crecimiento y la expansión del

blastocisto, el aumento de líquido en el blastocele, las contracciones rítmicas del embrión que se producen como consecuencia de ambos factores y otras causas variables según la especie, como la producción de una lisina por el epitelio uterino, cambios en la integridad de la zona por factores enzimáticos producidos por el útero o el embrión, o la exposición al ambiente uterino sensibilizado por los estrógenos (García, 2005).

Tras la eclosión, los blastocistos porcinos permanecen en la luz del útero hasta el día 13, lo que constituye un periodo preimplantacional muy largo si se le compara con el de los humanos o los animales de laboratorio. El diámetro de los blastocistos recién eclosionados es de 0.2 mm aproximadamente (Martínez, 2002).

2.4 Maduración de ovocitos *in vitro*

La producción *in vitro* de embriones es un proceso que comprende: la obtención y maduración de ovocitos *in vitro*, la capacitación *in vitro* de los espermatozoides, el cocultivo de ambos gametos o IVF, y el cultivo de los embriones resultantes hasta alcanzar el estadio de blastocisto (Martínez, 2002).

Los ovocitos foliculares porcinos pueden exitosamente madurarse *in vitro* y pueden alcanzar su potencial desarrollo después de la IVF (Hong y Lee, 2007). La maduración del ovocito *in vitro* incluye la maduración nuclear así como la maduración citoplasmática, estos dos procesos deben ser considerados procesos independientes (Schoevers et al., 2005). Sin embargo, aunque la maduración nuclear se lleva a cabo durante la IVM, la maduración del citoplasma es todavía inapropiada. Ya que existe una frecuente ocurrencia de poliespermia y bajos índices de desarrollo después de la fertilización de los ovocitos madurados *in vitro* (Gil et al., 2010). Las condiciones *in vitro* quizá causen efectos negativos en el movimiento de las mitocondrias dentro del citoplasma (Sun et al., 2001b), en la síntesis de proteína (Ellederova et al., 2006), y en el transporte de señales e iones (especialmente calcio) (Sun et al., 2001b; Sun y Nagai, 2003). El contenido intracelular de glutatión y la habilidad del citoplasma para descondensar el núcleo del espermatozoide o para inducir la formación del pronúcleo masculino ha sido usado como indicador de maduración citoplasmática (Gil et al., 2010).

El proceso de expansión de las células del cúmulus, que ocurre *in vitro* e *in vivo*, es uno de los mayores indicadores de maduración del ovocito. La maduración nuclear de ovocitos es fácilmente evaluada morfológicamente por la presencia de un primer cuerpo polar, pero faltan métodos no invasivos para evaluar la maduración citoplasmática (Katska-Ksiazkiewicz, 2006).

2.4.1 Condiciones de cocultivo

El tiempo de cultivo necesario para obtener los ovocitos madurados *in vitro* en el estadio nuclear de metafase II es bastante aproximado al requerido *in vivo*. Yamauchi et al. (1996) apuntan que el periodo óptimo de cultivo es de 42 a 44h. La temperatura de incubación más utilizada, tanto en la IVM como en la IVF y el cultivo de embriones se encuentran cercanas a la temperatura corporal de la cerda que es de 39°C. La atmósfera de cultivo empleada como rutina en los protocolos de producción de embriones porcinos es de 5% de CO₂ y 95% de humedad. Normalmente, los cultivos *in vitro* utilizan medios ricos en bicarbonato sódico para mantener el pH adecuado (García, 2005).

2.4.2 Medios de cultivo

Para la maduración *in vitro* de los ovocitos porcinos, se han empleado distintos medios de cultivo, según el grupo de trabajo o el propósito del estudio. Los medios se pueden clasificar en sencillos o complejos, dependiendo de la cantidad de productos incluidos en su composición. Ejemplos de medios sencillos ampliamente utilizados en la IVM de los ovocitos porcinos son el medio el medio Krebs Ringer Bicarbonato (Naito et al., 1988), el medio North Carolina State University - 23 (NCSU-23) (Peeters y Wells, 1993) y el medio Whitten (Funahashi 1994), que se suelen preparar en el propio laboratorio. Entre los medios complejos más utilizados están el medio de cultivo de tejidos 199 (TCM199) (Zheng y Sirard, 1992) y el Waymouth (Yoshida et al., 1993), que debido al elevado número de componentes, se suelen adquirir en preparados comerciales. A estos medios regularmente se les adiciona cisteína, cisteamina, factor de crecimiento epidérmico

(EGF), glutatión, beta mercaptoetanol, 9-cis ácido retinoico y hormonas que mejoran la maduración citoplasmática y el subsecuente desarrollo de los ovocitos de cerdo (Gil et al., 2010). También muchos de los medios son suplementados con gonadotropinas, especialmente con hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) (Abeydeera, 2002).

Los medios de cultivo se dividen en definidos o indefinidos, conforme al tipo de suplementos que contengan. Los medios definidos son aquellos en los que se conoce su composición bioquímica y cantidad, los medios no definidos son aquellos a los cuales se les agrega materiales biológicos que contienen cantidades y metabolitos desconocidos. La tendencia actual es, en la medida de lo posible, la eliminación de suplementos no definidos, pues contienen factores desconocidos que dificultan la identificación de los mecanismos involucrados en la regulación de los procesos en estudio. Sin embargo, se requiere de estudios sobre los efectos que tienen los diversos factores contenidos en los materiales biológicos que pueden ayudar a la formulación de mejores medios químicamente definidos (Abeydeera, 2002).

Los medios de maduración se suelen enriquecer con suero fetal bovino (Nagai y Moor, 1990), suero de cerdo recién nacido, BSA (Nagai et al., 1984) y fluido folicular porcino (Yoshida et al., 1992) como fuentes de proteínas.

Sólo los medios definidos deberían ser usados para estandarizar las investigaciones entre diferentes laboratorios (Gil et al., 2010).

2.4.3 Factores que influyen en la IVM

Se ha reportado que los ovocitos pequeños tienen un menor índice de penetración comparado con los ovocitos grandes. El crecimiento inmaduro de los ovocitos de cerda tienen una baja penetrabilidad comparado con los ovocitos totalmente maduros y de gran crecimiento, esto muestra que la habilidad de desarrollo de los ovocitos pequeños de folículos antrales menores a 2.2 mm de diámetro, es pobre, presumiblemente porque esos ovocitos pequeños están todavía creciendo, sin embargo la información es variable en cuanto a los ovocitos de folículos de diferentes tamaños (Lucas et al., 2003).

En cerdos, cuando la maduración y el desarrollo competitivo de los ovocitos de cerdas prepúberes y cerdas adultas fueron comparados, se encontró que los ovocitos de cerdas adultas maduran a la segunda metafase de la meiosis en un menor tiempo que las cerdas prepúberes y mostraron altos índices de desarrollo al estadio de blastocisto. Esto indica que los ovarios adultos contienen ovocitos con un alto desarrollo competitivo comparado con los ovarios prepúberes (Nagai, 2001).

Es generalmente aceptado que las células del cúmulus durante el periodo de la maduración son el soporte de la IVM de los ovocitos a metafase II y están involucradas en la maduración citoplasmática necesaria para desarrollar una buena capacidad post fertilización, tal como la formación de pronúcleos masculinos, especialmente en los ovocitos porcinos y el desarrollo al estado de blastocisto. Sin embargo, la presencia de las células del cúmulus durante la maduración no parece ser un requerimiento absoluto en bovinos, ya que los blastocistos obtenidos de ovocitos libres de cúmulus incubados con piruvato de sodio tienen una capacidad de desarrollo normal después de la transferencia embrionaria en becerras. En contraste, los ovocitos de porcino libres de las células del cúmulus no se pueden desarrollar más allá del estadio de 4 células, incluso después de madurar en un medio que contenía cisteína y teniendo una alta concentración de glutatión y un alto índice de formación de pronúcleos masculinos después de la IVF (Nagai, 2001).

En cerdos, la competencia del desarrollo de los ovocitos es afectada por el diámetro de los folículos de los cuales los ovocitos fueron colectados. Por lo tanto, las células foliculares y los factores locales intraovarios en el fluido folicular quizá afecten la reactivación meiótica de los ovocitos y su subsecuente desarrollo después de la IVF. En efecto, la suplementación con fluido folicular en el medio de IVM ha tenido un efecto beneficioso sobre la maduración nuclear del complejo cúmulus-ovocito de porcino (Agung et al., 2010). La adición de células de la granulosa al medio de cultivo promueve la maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos (Agung et al., 2010).

2.4.4 Clasificación de ovocitos

- Ovocitos categoría I (Excelentes). Presentan un citoplasma oscuro y uniforme, combinado con 5 ó más capas compactas de células del cúmulus.

- Ovocitos categoría II (Buenos). Presentan un citoplasma oscuro y uniforme, conjuntamente con una corona radiada completa, pero menos de 5 capas de células del cúmulus.

- Ovocitos categoría III (Regulares). Presentan una pérdida de la uniformidad del citoplasma, la corona radiada se presenta incompleta y las capas de células del cúmulus presentes son menos compactas.

- Ovocitos categoría IV (Malos). Presentan citoplasma no homogéneo o fragmentado, las células de la corona radiada y del cúmulus se encuentran disgregadas o ausentes en su totalidad (Sánchez y Silva, 2003).

2.5 Fertilización de ovocitos in vitro

La IVF ha sido definida como la penetración de los espermatozoides capacitados en los ovocitos maduros fuera del tracto genital femenino (García, 2005).

2.5.1 Condiciones de cocultivo

La duración óptima del cocultivo de los ovocitos con el semen va a depender de las condiciones a las que sean sometidos los espermatozoides. Por ejemplo, los tratamientos de lavado, centrifugación o selección previos a la IVF (Matás et al., 2002), así como las diferencias en la composición del medio de fertilización (Funahashi y Nagai, 2001), pueden dar lugar a variaciones en el estado de capacitación de los espermatozoides que, según Funahashi y Nagai (2001), podrían influir en el tiempo que precisan estos para penetrar al ovocito. De modo que el tiempo óptimo de cocultivo va a depender de las características de cada estudio.

Las condiciones más utilizadas en la incubación de los ovocitos en la IVF son prácticamente las mismas que las utilizadas para la IVM; un 5% de CO₂ en atmósfera saturada de humedad y una temperatura de 38.5 a 39 °C (García, 2005).

2.5.2 Medios de cultivo

Los medios más comunes para la IVF incluyen el medio Tris-buffer (TBMm), TCM199, Medio de tyrodes modificado (TALPm) y el medio Whitten's modificado. Muchos de estos medios son suplementados con cafeína que promueven en la motilidad espermática y que inducen la capacitación antes de la inseminación y/o durante el cocultivo con los ovocitos (Gil et al., 2010).

2.5.3 Prevención de la poliespermia *in vitro*

Aunque en cerdos los cigotos poliespérmicos pueden desarrollarse hasta el estadio de blastocisto, los embriones poliploides fallan para desarrollarse por completo. Por lo tanto la penetración poliespérmica es todavía una de las principales causas para reducir la eficiencia en la producción lechones después de la IVF, cuando comparamos una fertilización normal *in vivo* con una *in vitro*, los ovocitos fertilizados *in vitro* son expuestos a un gran número de espermatozoides capacitados por un gran periodo de tiempo. Quizá no sea fácil resolver este problema, porque un alto índice de poliespermia también fue observado incluso *in vivo* cuando el número de espermatozoides en el sitio de fertilización fue incrementado artificialmente (Nagai, 2001). Aunque las técnicas de IVM y IVF en ovocitos de cerda han sido mejoradas en años recientes, las altas incidencias de fertilización poliespérmica restan la producción exitosa de grandes números de embriones porcinos *in vitro* (Gil et al., 2004).

El uso de fluido oviductual de cerdas en el día 21 del ciclo estral, en el medio de maduración en 10, 30 o 100% de concentración para incubar ovocitos por 1.5 horas antes de la IVF, reduce los índices de fertilización poliespérmica sin que baje el índice de la IVF (Nagai, 2001). Una reducción del periodo de exposición ovocito-espermatozoide también ha demostrado que incrementa la incidencia de monoespermia. En efecto los sistemas más actuales de IVF usan de 5 a 6 horas de tiempo de coincubación espermatozoide-ovocito, comparado con las 12 a 18 horas de tiempo de coincubación que se usaba en los sistemas de IVF originales en porcinos (Gil et al., 2004). Recientemente los índices de penetración y desarrollo de blastocistos fueron mejorados con una simple modificación en el

procedimiento de la IVF, reduciendo la coincubación de 5 horas a 10 minutos. Esto sugiere que el extender los tiempos de coincubación, tiende a incrementar la interacción resultando en una alta incidencia de penetración poliespérmica. Sin embargo Gil et al. (2004) encontró que cortos periodos de coincubación espermatozoide-ovocito durante la IVF no mejora la eficiencia de la producción de embriones de cerda *in vitro*, aunque es necesario el desarrollo de nuevas estrategias para minimizar el número de espermatozoides capacitados presentes en la fertilización para obtener altos índices de penetración y monoespermia.

En los espermatozoides congelados-descongelados usados para determinar la eficiencia de la IVF, es mejor la coincubación de 10 minutos combinados con altos índices de espermatozoides-ovocito (1000 a 1500 espermatozoides por ovocito) y para largos tiempos de coincubación es mejor combinarlo con bajos índices de espermatozoides-ovocito (500 espermatozoides x ovocito). Los espermatozoides dirigidos a la zona pelúcida requieren un máximo de 2 horas en un medio apropiado para penetrar los ovocitos (Gil et al., 2007).

Almiñana et al., (2008) encontraron que tiempos tan cortos como 2 minutos son lo bastante largos para obtener buenos índices de fertilización y similares a los obtenidos actualmente con tiempos largos (6 horas) en IVF en porcinos. Se ha especulado que parte del problema de la poliespermia es debido a una inadecuada maduración ovocitaria; sin embargo, cuando se utilizan ovocitos recién ovulados y fertilizados *in vitro* también se obtienen fertilizaciones poliespérmicas (Coy et al., 1993). Tomando en conjunto lo descrito anteriormente, hay que pensar en la poliespermia como un problema complejo en el que están involucradas tanto las condiciones de IVM del ovocito, como las de capacitación *in vitro* de los espermatozoides y de cocultivo *in vitro* de los espermatozoides con los ovocitos.

2.6 Cultivo de embriones

2.6.1 Condiciones del cultivo

Las condiciones más utilizadas en la incubación de los embriones *in vitro* son prácticamente las mismas que las utilizadas para la IVM y la IVF; un 5% de CO₂ en atmósfera saturada de humedad y una temperatura de 38.5-39 °C (García, 2005).

2.6.2 Medios de cultivo

El medio North Carolina State University (NCSU-23 y NCSU-37) es el medio más comúnmente empleado en los sistemas de cultivo de embriones de porcinos, ya que es el medio con el que mayor porcentaje de blastocistos se ha obtenido y ha sido usado extensamente por diferentes investigadores (Gil et al., 2010).

Los medios de cultivo embrionario suelen ser enriquecidos con BSA (Petters y Wells, 1993) y suero fetal bovino (Koo et al., 1997). El suero fetal bovino al igual que la BSA proporcionan al medio de cultivo ciertos factores, como aminoácidos y proteínas, además el suero fetal bovino también proporciona sustratos energéticos, vitaminas y factores de crecimiento (Bavister, 1995; Martínez, 2002), importantes en la formación y eclosión de los blastocistos (Gardner et al., 1994). Uno de los problemas que presenta la utilización de suero fetal bovino o BSA, además de la falta de definición de los medios, es la variabilidad encontrada entre diversos lotes del mismo producto (Dobrinsky et al., 1996). Estos medios todavía no son del todo apropiados por dos razones: la primera es debido a que son medios semi-definidos y segundo porque estos medios todavía son subóptimos para el desarrollo embrionario (Gil et al., 2010).

2.7 Arginina

La arginina es un aminoácido semiesencial o condicionalmente esencial y es uno de los aminoácidos metabólicamente más versátiles, sirve como un precursor para la síntesis de urea, óxido nítrico, poliaminas, prolina, glutamato, creatina y agmatina (Figura 1). Su versatilidad provee un gran terreno para los investigadores en muchas áreas de la investigación biomédica (Morris, 2006).

Las fuentes de la arginina libre dentro del cuerpo son: la proteína de la dieta, la síntesis endógena y las proteínas del cuerpo (Figura 1). Cerca del 40% de la arginina de la dieta es catabolizada por el intestino antes de que pueda entrar en la circulación (Wu y Morris, 1998). Durante el ayuno, cerca del 85% de la arginina de la circulación deriva de la proteína endógena y el resto se origina de la síntesis de novo (Wu y Morris, 1998). La mayoría de la síntesis de novo de la arginina ocurre en una colaboración metabólica entre el intestino delgado y el riñón en el que es conocido como el eje intestino-renal de la síntesis de la arginina (Rabier y Kamoun, 1995). La magnitud de la síntesis endógena es lo suficientemente grande para que la arginina no sea un aminoácido esencial de la dieta. Sin embargo, la síntesis endógena de la arginina no puede satisfacer las necesidades de niños en crecimiento o adultos bajo estrés catabólico o con disfunción del intestino delgado o riñón; debido a esto, la arginina es clasificada como un aminoácido semiesencial o condicionalmente esencial (Rabier y Kamoun, 1995; Flynn et al., 2002).

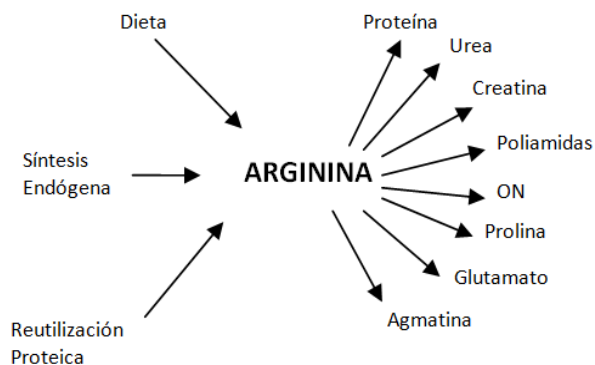


Figura 1. Fuentes y destinos metabólicos de la arginina (Adaptada de Morris, 2006).

Síntesis

Algunas de las enzimas que participan en la síntesis de la arginina están presentes en varios tipos celulares, mientras que la expresión de otras enzimas es altamente restringida (Wu and Morris, 1998). La ornitina aminotransferasa, la argininosuccinato

sintetasa y la argininosuccinato liasa están ampliamente distribuidas en el tejido animal (Wu et al., 1997), mientras que la ornitina carbamoiltransferasa está restringida al hígado y a la mucosa intestinal (Wu y morris, 1998).

En adultos, la mayoría de la síntesis endógena de la arginina involucra una vía inter-órgano (también conocida como el eje intestino-renal) en la cual el intestino delgado libera la citrulina dentro de la circulación sanguínea la cual es extraída principalmente por el riñón para la conversión a arginina (Dhanakoti et al., 1990). La síntesis endógena de la arginina juega un papel importante en la regulación homeostática de la arginina en neonatos y cerdos en crecimiento (Wu et al., 1997), pero no tiene mayor importancia en la regulación homeostática de la arginina en humanos adultos sanos (Castillo et al., 1993). De todos los mamíferos destetados o adultos, los cerdos son la única especie cuyo intestino delgado libera endógenamente la arginina sintetizada dentro de la circulación venosa la cual resulta del balance entre la síntesis de la arginina y el catabolismo por la mucosa intestinal (Wu y Morris, 1998).

Al nacimiento, el intestino delgado es el mayor sitio de síntesis neta de la arginina (Blachier et al., 1993), pero gradualmente llega a ser el mayor sitio de producción de la citrulina además muestra un incremento en la expresión de la arginasa intestinal (Blachier et al., 1993). Esta transición es compensada por el gradual incremento de la capacidad del riñón para sintetizar la arginina a partir de la citrulina (Wu y Morris, 1998). En adición, la glutamina, el glutamato y la prolina son también importantes precursores para la síntesis de la citrulina y la arginina (Wu, 1997).

Aproximadamente el 60% de la síntesis de la arginina en adultos mamíferos ocurre en el riñón (Dhanakoti et al., 1990), en donde la citrulina es extraída de la sangre y convertida a arginina por la acción de la argininosuccinato sintetasa y la argininosuccinato liasa, las cuales están localizadas en el tubo contorneado distal (Levillain et al., 1990). Se han llevado a cabo estudios en los cuales se ha establecido que el riñón es el mayor órgano involucrado en la síntesis de la arginina endógena (Dhanakoti et al., 1990).

Vías de acción

Existe un complejo de vías altamente reguladas a través de las cuales se metaboliza la arginina y que no son completamente entendidas a nivel celular (Morris, 2006). La arginina es el sustrato de 4 enzimas encargadas de su metabolismo: la arginasa, la óxido nítrico sintetasa (NOS), la arginina: glicina amidinotransferasa y la arginina descarboxilasa. La arginasa y la NOS son expresadas como 2 o 3 isoenzimas respectivamente, que son producto de distintos genes (Wu y Morris, 2004). La acción de estas 4 enzimas da como resultado la producción de 7 moléculas de bajo peso molecular (Figura 1). La presencia de una diferenciada expresión tisular de las enzimas así como de los transportadores implicados en el metabolismo de la arginina produce diferentes resultados metabólicos (Wu y Morris, 1998).

2.7.1 Efecto de la arginina sobre la reproducción

Como ya se ha mencionado, la arginina juega múltiples papeles en el metabolismo animal, ya que sirve como sustrato para la síntesis de proteína, es intermediario en el ciclo de la urea y es precursor para la síntesis de varias moléculas metabólicas importantes, incluyendo el óxido nítrico y las poliaminas.

La administración de arginina mejora la restricción del crecimiento intrauterino en mujeres (Xiao, y Li. 2005), mientras que la suplementación de arginina en la dieta ayuda a la supervivencia fetal y el crecimiento en ratas (Zeng et al 2008) y cerdas (Mateo et al., 2007). Adicionalmente, la arginina es la fuente de nitrógeno más abundante en fetos de cerdos y es uno de los aminoácidos más abundantes depositados en el tejido fetal (Wu et al., 1999) y en el fluido alantoideo del embrión porcino durante la gestación temprana (Wu et al. 1996). El feto obtiene la arginina directamente de la circulación materna vía el flujo de sangre útero-placenta e indirectamente vía la citrulina (Wu et al., 2008).

La arginina es el precursor del óxido nítrico y las poliaminas (Wu y Morris , 1998). El óxido nítrico es el mayor factor de relajación derivado del endotelio (Wu y Meininger, 2000) y juega un papel importante en la regulación del flujo sanguíneo placentario-fetal y por lo tanto en la transferencia de nutrientes y O₂ de la madre al feto (Bird et al., 2003). De igual forma, las poliaminas regulan la síntesis de proteína y DNA, por lo tanto, también la

proliferación y la diferenciación celular (Igarash y Kashiwagi, 2000 “Wu et al., 2007”). Gran evidencia muestra que el óxido nítrico y las poliaminas son claves en la regulación de la angiogénesis y la embriogénesis, así como del crecimiento placentario y fetal (Reynolds y Redmer, 2001; Wu et al, 2004).

2.7.2 Óxido nítrico

El óxido nítrico es un gas radical libre inorgánico, es sintetizado por la NOS a partir de la arginina como una señal extra e intracelular (Knowles y Moncada, 1994). La NOS es una enzima existente en tres isoformas. Dos de estas NOS, la neuronal (nNOS, también conocido como tipo I y originalmente identificada en tejido neuronal) y la endotelial (eNOS, también conocido como tipo 3 y originalmente identificada en células vasculares endoteliales), son sintetizadas de manera constitutiva y parecen ser responsables de la liberación basal continua de óxido nítrico independientemente de la demanda fisiológica. La tercera isoforma NOS inducible (iNOS también conocida como tipo II y originalmente identificada en macrófagos y hepatocitos), es expresada en respuesta a citoquinas y lipopolisacáridos inflamatorios (Knowles y Moncada, 1994; Hattori et al., 2000).

Síntesis

Es claro que la síntesis de óxido nítrico a partir de la arginina es una reacción la cual involucra 2 pasos separados de mono oxigenación. La N^G-hidroxiarginina es un intermediario formado por una reacción que requiere O₂, una nicotidamida adenina dinucleótido sulfóxido (NADPH) y la presencia de tetrahidrobiopterin. El segundo paso en la reacción de la NOS resulta en la oxidación de N^G-hidroxiarginina para formar la citrulina y el óxido nítrico (Knowles y Moncada, 1994).

Vías de acción

El óxido nítrico es un reconocido activador de la guanilato ciclasa, llevando a un incremento en los niveles de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) en células blanco (Jablonka-Shariff y Olson, 1997). Sin embargo, recientes estudios sugieren que el óxido nítrico puede también inducir sus efectos biológicos vía rutas no dependientes de cGMP. También, el óxido nítrico ha sido mostrado como un activador directo de la familia de la MAPK (Lander et al., 1996). También puede actuar como un eliminador de los radicales libres e inactivar el O₂, resultando en la generación de peroxinitrito, un potente oxidante, el cual es capaz de inducir citotoxicidad por inducción de peroxidación de lípidos, daño en la membrana, ruptura del DNA e inactivación enzimática (Bu et al., 2003).

Se ha implicado al óxido nítrico en varios aspectos de la función reproductiva. El papel de los radicales libres, tal como el óxido nítrico en el sistema reproductivo es complejo, ellos quizá influyan en los procesos celulares por varios mecanismos y con efectos positivos y negativos. Los radicales libres deben ser estrechamente controlados para evitar destrucción inesperada del tejido; sin embargo, se conoce poco de como ocurre esto en un sistema integrado tal como el folículo ovárico (Mitchell et al., 2004).

Las tres isoformas de la NOS han sido identificadas en el sistema reproductivo donde el óxido nítrico juega un importante papel en una variedad de funciones reproductivas (Bu et al., 2003), como la contractilidad uterina, la erección peneana, la ovulación y la fertilización (Jablonka-Shariff y Olson, 1997; Kuo et al., 2000; Mitchell et al., 2004), el comportamiento sexual, la implantación embrionaria (Heidari Amale et al., 2011), la angiogénesis placentaria, y el flujo sanguíneo uterino durante la gestación (Know et al., 2003). En el ovario, la NOS ha sido mostrado que participa en una variedad de procesos reproductivos, tal como el desarrollo folicular, la ovulación, la función del cuerpo lúteo, la maduración meiótica del ovocito (Bu et al., 2003; Dubey et al., 2011) y la atresia de células foliculares (Motta y Fernández, 2001). En adición a esto, el mRNA de la NOS ha sido detectado en células de la granulosa y lúteas de humano cultivadas, jugando un papel antiesteroideogénico (Motta y Fernández, 2001).

2.7.2.1 Efecto sobre el desarrollo folicular

Se ha demostrado la presencia de la NOS en el ovario, indicando el potencial de producción de óxido nítrico como un participante activo en el desarrollo folicular (Mitchell et al., 2004). Ha sido reportado que los folículos tempranos producen más óxido nítrico que los que están en estados de desarrollo tardío, mostrando que la actividad de la NOS cambia durante el desarrollo folicular. Por lo tanto, el sistema NOS/óxido nítrico quizá tenga un importante papel durante las diferentes fases del desarrollo en folículos ováricos de los mamíferos (Dubey et al., 2011).

La omisión de la arginina reduce significativamente la supervivencia folicular y la ovulación. Además el uso de un donador o inhibidor de óxido nítrico ha probado que este juega un papel importante en la función ovárica y el desarrollo folicular (Huo et al., 2005). Ya que los folículos están siendo continuamente generados y regulados por factores de crecimiento, es factible que el óxido nítrico derivado de la iNOS actúe como una molécula reguladora del crecimiento (Motta y Fernández, 2001).

Un mecanismo a través del cual el óxido nítrico quizá esté involucrado en el control del desarrollo folicular es su efecto sobre la apoptosis, la muerte celular programada por la cual la mayoría de los folículos ováricos son perdidos durante la vida postnatal (Li et al., 1998). Los resultados sobre el efecto del óxido nítrico sobre la foliculogénesis sugieren que el óxido nítrico que localmente se produce contribuye a modular el desarrollo folicular y previene la apoptosis en una menor concentración, mientras que concentraciones altas promueven la muerte celular vía formación de peroxinitrato (Tamanini et al., 2003).

2.7.2.2 Efecto sobre la maduración del ovocito

Los resultados acerca del efecto del sistema NOS/óxido nítrico sobre la maduración del ovocito son diversos ya que algunos investigadores muestran que el óxido nítrico inhibe (Jablonka-Shariff y Olson, 1998) y otros tienen reportes que estimulan la maduración nuclear (Sengoku et al., 2001; Huo et al., 2005; Heidari Ameal et al., 2011).

La síntesis de óxido nítrico es importante para la maduración del ovocito. Se ha observado que ratas tratadas con inhibidores de la NOS no solo muestran índices bajos de ovulación, también tienen una maduración meiótica del ovocito anormal. Específicamente

la inhibición de NOS/óxido nítrico resulta en un significativo bajo porcentaje de ovocitos maduros en la metafase II y un gran porcentaje de ovocitos atípicos (Jablonka-Shariff y Olson, 1997). Además, se ha demostrado que el nitroprusiato de sodio, un donador de óxido nítrico, estimula la maduración meiótica en ratón (Huo et al., 2005; Dubey et al., 2011). También se ha reportado que el óxido nítrico derivado de la iNOS es necesario para la expansión de las células del cúmulus y la maduración meiótica por mediación de la función de las células del cúmulus, el óxido nítrico derivado de la eNOS también está involucrado en la maduración meiótica en porcinos (Tao et al., 2005).

Por el contrario, Nakamura et al. (2002) sugieren que el óxido nítrico derivado de la iNOS es uno de los inhibidores de la maduración del ovocito. Una alta concentración intrafolicular de óxido nítrico parece jugar un papel en el arresto meiótico de ovocitos (Nakamura et al., 2002). Se ha reportado que el exceso de óxido nítrico inhibe la ruptura de la vesícula germinal mientras que la reducción de óxido nítrico durante las horas iniciales de la maduración *in vitro* estimula la ruptura de la vesícula germinal (Dubey et al., 2011). Además, los resultados también indican que el óxido nítrico tiene una acción dual sobre el desarrollo folicular y la maduración de los ovocitos *in vitro* dependiendo de la concentración, debido a que el exceso de óxido nítrico puede tener efecto y quizá reaccione con otros radicales libres para generar peroxinitratos (ONOO^-), las cuales son moléculas tóxicas más potentes y quizá sean responsables de inhibir la maduración meiótica de ovocitos foliculares (Dubey et al., 2011). Sin embargo estos datos sugieren que la producción de óxido nítrico en el ovario y el ovocito, juega un papel importante en la ovulación y la maduración meiótica del ovocito (Jablonka-Shariff y Olson, 1998).

2.7.2.3 Efecto sobre la fertilización

El óxido nítrico ha sido detectado en testículos, epidídimo, próstata y vesículas seminales de humanos y ratas (Ehren et al., 1994; Burnett et al., 1995). Experimentos realizados con anticuerpos producidos contra la NOS mostraron que esta enzima está asociada con el acrosoma y la cola de espermatozoides de ratones (Herrero et al., 1996) y parecen estar involucradas en el proceso de la fertilización, incluyendo la motilidad

espermática y la reacción acrosomal (Herrero et al., 1997). Bajas concentraciones de óxido nítrico causan un incremento significativo en la capacitación (Zini et al., 1995) y unión con la zona pelúcida (Sengoku et al., 1998).

El óxido nítrico es producido por la capacitación de los espermatozoides humanos y quizá actúe como un mensajero celular para modular las vías de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) involucradas en la capacitación y la fosforilación de la proteína tirosina (Herrero et al., 2000). Por otro lado Machado-Oliveira et al. (2008) mencionan que el óxido nítrico regula el metabolismo del calcio almacenado en los espermatozoides humanos. Además ha sido reportado que el óxido nítrico de los espermatozoides es el primer activador de la movilización de Ca^{2+} en el citoplasma del ovocito del erizo de mar provocando su activación (Kuo et al., 2000).

Estudios en fertilización *in vitro* han demostrado que la adición de diferentes concentraciones de inhibidores de la NOS a los medios de capacitación reducen los porcentajes de fertilización dependiendo de la concentración, mostrando que la actividad de la NOS es requerida por el espermatozoide para la fertilización (Herrero et al., 1996).

Interesantemente, un estudio realizado en ratas determinó que la administración oral de arginina inhibía la fertilidad de machos sin comprometer la competencia sexual, concluyendo que la producción de óxido nítrico quizá tenga efectos negativos en la fertilidad del macho (Ratnasooriya y Dharmasiri, 2001).

2.7.2.4 Efecto sobre el desarrollo embrionario

Ya que se ha observado la importancia del óxido nítrico en los procesos reproductivos, incluyendo la implantación embrionaria, la gestación y el parto (Rosseli et al., 1998), ha sido sugerido que la producción de óxido nítrico quizá también sea importante en el desarrollo temprano (Manser et al., 2004). Sengoku et al. (2001) observaron que altas concentraciones de óxido nítrico inhiben el desarrollo embrionario y que los inhibidores de óxido nítrico retardan el desarrollo embrionario. Se ha demostrado que la inhibición del desarrollo embrionario producido por una falta de óxido nítrico puede

ser reversible por la adición de donadores del mismo y que su producción debe ser regulada dentro de límites específicos (Tranguch et al., 2003).

Los mecanismos de acción del óxido nítrico durante el desarrollo embrionario son desconocidos, pero la respiración mitocondrial representa una potencial vía (Manser et al., 2004). Ha sido previamente propuesto que el índice de cAMP y cGMP quizá sean importantes en la regulación de la implantación, el crecimiento y la diferenciación embrionaria (Dey et al., 1978). Tranguch et al. (2003) mostraron que el óxido nítrico participa en la regulación del desarrollo embrionario, al menos vía cGMP.

2.7.3 Poliaminas

Las poliaminas son moléculas básicas pequeñas que juegan múltiples papeles esenciales en la fisiología de los mamíferos (Pegg, 2009). La putrescina, la espermidina y la espermina son sintetizadas en células de mamíferos. La agmatina no es producida por mamíferos (Coleman et al., 2004) pero es sintetizada por plantas y muchas bacterias, incluyendo la flora intestinal. Las poliaminas son conocidas por ser esenciales en diversas funciones reproductivas en los mamíferos (Pegg, 2009).

Síntesis

Las poliaminas producidas endógenamente son sintetizadas de los aminoácidos arginina y prolina a través de la ornitina (Wu y Morris, 1998) y/o la metionina (Tabor y Tabor, 1984). La ornitina descarboxilasa (OCD1), la enzima limitante de la velocidad de biosíntesis y entre la más altamente regulada de las enzimas eucariotas, cataliza la descarboxilación de la ornitina para producir la putresina. La putresina se combina con la S-denosilmetionina descarboxilada y se transforma a espermidina y espermina por la espermidina y espermina sintetasa respectivamente (Lefèvre et al., 2011).

Vías de acción

Debido a que las poliaminas son totalmente protonadas en pH fisiológico, ellas son consideradas supercationes que tienen la capacidad de interactuar fuertemente con macromoléculas polianiónicas como ácidos nucleicos, proteínas y fosfolípidos (Wallace et al., 2003). Por tal motivo ellas juegan múltiples y diversos papeles en la función celular (Lefèvre et al., 2011). Las poliaminas son conocidas como estabilizadoras de la estructura del DNA, inducen la remodelación de la cromatina y de este modo regulan la expresión de genes (Wallace et al., 2003, Huang et al., 2009). Se ha propuesto que las poliaminas se unen a sitios cargados sobre la interface proteica, afectando las interacciones electroestáticas proteína-proteína (Berwanger et al., 2010). Las poliaminas parecen jugar un papel esencial en la proliferación celular, con incremento intracelular que ocurre durante la transición G₀/G₁ y G₂/M (Alm y Oredsson, 2009). Además las poliaminas también han sido implicadas en los programas de muerte celular (Seiler y Raul, 2005) y en modificaciones epigenéticas de la cromatina (Heby, 1995).

Se ha encontrado que las poliaminas juegan un papel importante en la espermatogénesis (Kaipia et al., 1990), la foliculogénesis, la maduración del ovocito (Bastida et al., 2005), la embriogénesis (Muzikova y Clark, 1995), la implantación (Guha y Jänne, 1976) y la placentación (López et al., 2009). Aunque un gran número de funciones moleculares se han atribuido a las poliaminas, los mecanismos por los cuales modulan el proceso reproductivo son en su mayoría desconocidos (Lefèvre et al., 2011).

2.7.3.1 Efecto sobre el desarrollo folicular

La distribución de la OCD1 en el ovario es interesante debido a que la proteína se localiza en la teca interna de los folículos preantrales y antrales (Icekson et al., 1974; Persson et al., 1986). La estimulación con gonadotropina coriónica equina (eCG) induce el mRNA y la expresión de la proteína OCD1, además de su actividad en células de la granulosa (Weiner y Dias, 1993). Se ha mostrado un incremento en la actividad de la OCD1 en las células de la granulosa de folículos antrales con la administración de dosis ovulatorias de LH o gonadotropina coriónica humana (hCG) en ratones (Bastida et al.,

2002) y ratas (Maudsley y Kobayashi, 1974). Las concentraciones de las poliaminas son esenciales para el desarrollo folicular y el exceso inhiben su efecto (Lefèvre et al., 20011).

2.7.3.2 Efecto sobre la maduración del ovocito

Hay poca información sobre el papel de las poliaminas sobre la maduración del ovocito en mamíferos. Estudios han revelado que un incremento en la actividad de la OCD1 en ovarios neonatales de conejo está asociado al comienzo de la profase meiótica (YoungLai y Byskov, 1983). Además, se ha observado un incremento de la OCD1 en el citoplasma de ovocitos de folículos antrales después la restauración de la meiosis en ovarios de ratones adultos (Bastida et al., 2005). Por otro lado, los cambios transitorios de Ca^{2+} asociados con la restauración meiótica de la maduración en ovocitos (Tosti et al., 2000) son consistentes con efectos de las poliaminas sobre los canales iónicos (Coburn, 2009). Por tanto, sería un mecanismo para la regulación directa de la meiosis en el ovocito por las poliaminas (Lefèvre et al., 2011). Otras investigaciones indican que las poliaminas son esenciales para la maduración citoplasmática de los ovocitos y que durante el estadio de metafase II protegen a los ovocitos de especies oxígeno reactivas que inducen la apoptosis (Zhou et al., 2009).

2.7.3.3 Efecto sobre la fertilización

Los niveles de la espermidina y la espermina son claramente bajos en el plasma seminal de hombres infértiles comparados con su contraparte normoespérmico (Calandra et al., 1996). En carneros ha sido demostrada una correlación positiva entre las concentraciones de la espermidina y la espermina con la motilidad de los espermatozoides (Melendrez et al., 1992). Existe un efecto directo cuando se adicionan poliaminas o arginina a los espermatozoides humanos con reducida o sin motilidad, incrementando la motilidad espermática (Morales et al., 2003).

Los mecanismos por los cuales las poliaminas afectan la motilidad son desconocidas (Lefèvre et al., 2011). Sin embargo existen estudios donde relacionan el efecto de las

poliaminas con el mejoramiento de la glicólisis (Pulkkinen et al., 1975) y la señalización intracelular (Casillas et al., 1980).

La reacción del acrosoma puede ser inducida en los espermatozoides bovinos capacitados, por exposición a bajas concentraciones de la espermina, mientras que altas concentraciones inhiben este efecto (Rubinstein et al., 1995). La espermina parece ser un factor descapacitante en el fluido seminal que quizá previene la capacitación prematura y la reacción acrosomal (Lefèvre et al., 2011).

2.7.3.4 Efecto sobre el desarrollo embrionario

La evidencia de la participación de las poliaminas en la embriogénesis temprana viene principalmente de la detección del incremento en la transcripción de la ODC1 en embriones de ratón de 2 células y en la expresión embrionaria que incrementa a través del estadio de blastocisto en esta especie (Domashenko et al., 1997). La actividad de la ODC1 en los embriones incrementa dentro de los estadios de 2 células y blastocisto temprano en el ratón (Alexandre, 1978). Similarmente ha sido reportado un incremento en los embriones de cerdo (Cui y Kim, 2005). Las poliaminas parecen mejorar el desarrollo y la supervivencia embrionaria *in vitro*. En el ratón, los ovocitos fertilizados *in vitro* e incubados con poliaminas muestran un alto índice de desarrollo hasta blastocistos (Muzikova y Clark, 1995).

Un potencial mecanismo para que la espermidina y la espermina afecten la proliferación embrionaria puede ser encontrado en los requerimientos celulares para estas poliaminas en la síntesis de hypusina, una lisina modificada que es única en eucariotas (Hyvönen et al., 2007). Este factor es un regulador de la proliferación (Zanelli y Valentini, 2007).

3. HIPÓTESIS

La administración de arginina en el medio de maduración y de cultivo embrionario con y sin BSA, incrementa el porcentaje de maduración y de desarrollo embrionario temprano de embriones porcinos producidos *in vitro*.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la adición de arginina durante los procesos de MIV de ovocitos, y el desarrollo temprano de embriones porcinos producidos *in vitro*, en los medios de maduración y cultivo embrionario con y sin BSA.

4.1 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la arginina en la MIV de ovocitos porcinos en un medio definido, sin BSA.
2. Determinar el efecto de la arginina en la MIV de ovocitos porcinos en un medio semidefinido, con BSA.
3. Determinar el efecto de la arginina en el desarrollo de embriones cultivados en medios de maduración y cultivo embrionario definidos, sin BSA.
4. Determinar el efecto de la arginina en el desarrollo de embriones cultivados en medios de maduración y cultivo embrionario semidefinidos, con BSA.

5. METODOLOGÍA

Los experimentos se realizaron en los laboratorios del Centro Nacional de Recursos Genéticos y en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal, ambos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias.

Material biológico

Los ovarios utilizados provenían de cerdas prepúberes, de una línea terminal, de 120 kg de peso vivo, sacrificadas en el rastro TIF PIGAMEX, ubicado en Tepatitlán, Jalisco.

5.1 Medios de cultivo

Todos los productos químicos utilizados en este estudio fueron adquiridos en la compañía Sigma-Aldrich (Toluca, México). La preparación de los medios se realizó con agua ultra pura, añadiendo los componentes y los suplementos específicos para cada medio en particular, los cuales se describen más adelante. La osmolaridad de los medios fue de 280 a 290 mOsm. Los medios se esterilizaron por medio de filtración, a través de un filtro de membrana con un diámetro de poro de 0.22 μm en una campana de flujo laminar y se conservaron a 4°C en condiciones estériles en frascos y tubos sellados. El pH se ajustó a 7.4. Los medios fueron incubados a 38.5°C, 5% de CO₂ y atmósfera saturada de humedad durante cuatro horas antes de ser utilizados.

Solución salina al 0.9 %

Se utilizó para la recuperación y lavado de los ovarios recolectados en el rastro.

Tyrode modificado (TL-HEPES-PVA)

Se utilizó para la recuperación y lavado de ovocitos seleccionados para ser madurados *in vitro* ((Bavister, 1989; Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición del medio de recuperación de ovocitos Tyrode modificado.

TL-HEPES-PVA	mM
Na Cl	114
K Cl	3.2
Na H₂PO₄	0.34
Lactato de sodio	10
Mg Cl₂ 6H₂O	0.5
Hepes	10
Piruvato de sodio	0.2
Sorbitol	12
Na HCO₃	2
Gentamicina	25 µg/ml
PVA	0.1%
Ca Cl₂ 2H₂O	2

Medio de maduración y cultivo embrionario

Para la maduración de los ovocitos se utilizó el medio NCSU-23 (Petters y Wells, 1993; Cuadro 2) enriquecido con 10 ng/ml de (EGF), cisteína 0.57 mM, 0.5 µg/ml de FSH, 0.5 µg/ml de LH y 1 µg/ml de 17-β estradiol. Para el cultivo embrionario se utilizó el medio NCSU-23 sin alguna suplementación (Cuadro 2).

Cuadro 2. Composición del medio NCSU-23 para la maduración de los ovocitos y el cultivo embrionario.

NCSU -23	mM
Na Cl	108.7
K Cl	4.8
KH₂ PO₄	1.2
Mg SO₄ 7H₂O	1.2
Glucosa	5.6
Glutamina	1
Taurina	7
Hipotaurina	5
Na HCO₃	25.1
Ca Cl₂ 2 H₂O	1.7
Gentamicina	25 µg/ml

Medio de fertilización

Se utilizó el medio TBMm (Abeydeera y Day, 1997; Cuadro 3)

Cuadro 3. Composición del medio TBM para la IVF.

TBM	mM
Na Cl	113.1
K Cl	3
Ca Cl₂ 2H₂O	7.5
Trisma base	20
Glucosa	11
Piruvato de sodio	5
BSA	0.4%
Cafeína	2.5

5.2 Obtención y transporte de los ovarios

Los ovarios recolectados se transportaron en un termo con solución salina 0.9%, previamente atemperada a 38°C, en un plazo máximo de una hora desde el sacrificio de los animales.

En el laboratorio los ovarios se lavaron una vez con alcohol al 70% (se sumerieron y sacaron inmediatamente) y una vez con solución salina. Se seleccionaron los ovarios con folículos de 3 a 6 mm y se desecharon aquellos que presentaban cuerpos lúteos, formaciones quísticas o morfología anormal. Los ovarios seleccionados se mantuvieron en solución salina a 38°C hasta el momento de su procesamiento.

5.3 Obtención y selección de los ovocitos

Los folículos ováricos de 3 a 6 mm se puncionaron y aspiraron con una aguja calibre 18 G y jeringa de 10 ml; el fluido folicular y el paquete celular se colocaron en un tubo Falcon de 15 ml, se dejó sedimentar durante 15 minutos para obtener el paquete celular y se eliminó el sobrenadante. El paquete celular se lavó y resuspendió con medio modificado TL-HEPES-PVA atemperado a 38°C, se dejó sedimentar y se eliminó el sobrenadante, esto se repitió 2 veces.

Una vez terminados los lavados, el paquete celular se vertió en una caja de búsqueda y se seleccionaron los ovocitos con citoplasma uniforme, granular y rodeados de una masa compacta de células del cúmulus.

5.4 Maduración *in vitro*

Los COCs seleccionados, se lavaron tres veces en gotas de 200 µl de medio de maduración NCSU-23. Se transfirieron a cajas de cuatro pozos en grupos de 50 ovocitos, que contenían 1 ml de medio de maduración y se incubaron a 38.5 °C, en una atmósfera saturada de humedad y 5% de CO₂ por 44 horas.

5.5 Fertilización *in vitro*

Preparación de los ovocitos

Tras finalizar la maduración, se eliminaron las células del cúmulus con 90 segundos de agitación en el vortex (máxima velocidad). Los ovocitos desnudos se lavaron tres veces en el medio de fertilización TBMm, previamente equilibrado en la incubadora por 4 horas y se eliminaron los ovocitos degenerados (zona pelúcida o citoplasma dañado). Grupos de 30 ovocitos, en 10 μ l de medio, fueron transferidos a microgotas de 80 μ L de medio de fertilización, cubiertas con aceite mineral en cajas de Petri; se incubaron a 38.5 °C, con saturación de humedad y 5% de CO₂, por 45 minutos hasta la fertilización.

Preparación de los espermatozoides y co-cultivo con los ovocitos

Para la fertilización de los ovocitos se utilizó semen congelado (Anexo 1). El medio para la preparación de los espermatozoides y la fertilización fue el medio TBM. La descongelación del semen se llevó a cabo a 39 °C por 2 minutos en baño de agua; se colocaron 500 μ l de semen en gradientes de Percoll de 45%:90% y fue centrifugado por 20 min a 700 g. El sobrenadante fue removido y el paquete de espermatozoides se resuspendió y lavó con 5 ml de TBM por 5 min a 1000 g (Yuan y Krisher, 2010). Los espermatozoides fueron contados y diluidos en TBM, para obtener una concentración de 5×10^6 espermatozoides/ml; se agregaron 10 μ l a las gotas que contenían los ovocitos para obtener una concentración final de 5×10^5 espermatozoides/ml (Yuan y Krisher, 2010). El co-cultivo ovocitos-espermatozoides realizó a 38.5 °C, con saturación de humedad y 5% de CO₂, durante 4 horas.

5.6 Cultivo embrionario

Después del periodo de coincubación, para eliminar los restos de espermatozoides, los presuntos cigotos se lavaron tres veces en gotas de 200 μ l de medio de cultivo de

embriones NCSU-23 previamente equilibrado en la incubadora. En grupos de 20 embriones, se transfirieron a gotas de 100 μ l del mismo medio en cajas de Petri, se cubrieron con aceite mineral y se incubaron a 38.5 °C, en atmósfera saturada de humedad, 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂ durante 168 horas (Hong y Lee, 2007). A las 168 horas postincubación, se revisaron los embriones.

5.7 Valoración microscópica de los ovocitos y embriones

Evaluación de la maduración de los ovocitos. La maduración nuclear se observó con un microscopio óptico a 400 aumentos. Al final de la maduración, grupos de 10 a 20 ovocitos fueron desnudados por medio de 90 segundos de agitación en el vortex (máxima velocidad). Los ovocitos desnudados se montaron sobre portaobjetos y se fijaron en 25% de ácido acético en etanol (v/v) por 10 min, en una platina térmica a 33 °C, para la remoción de lípidos. Después de la fijación, los ovocitos fueron teñidos con 1% (w/v) de orceína en 45% (v/v) de ácido acético y se examinaron al microscopio (Hong y Lee, 2007). Para la evaluación se utilizaron los siguientes criterios:

- (1) ovocitos no maduros - aquellos que presentaban vesícula germinal.
- (2) ovocitos maduros - aquellos que presentaban el primer cuerpo polar y los cromosomas en metafase II (Almiñana et al., 2008; Agung et al., 2010).

Evaluación del desarrollo embrionario. La división y el desarrollo embrionario se evaluaron a las 168 horas postinseminación en microscopio invertido. Se consideraron embriones divididos, aquellos que se encontraron a partir del estadio de 2 células en adelante; se consideraron mórulas a los embriones desde 8 células hasta la compactación; se consideraron blastocistos a aquellos que formaron blastocele, incluyendo en este grupo a los blastocistos no expandidos, expandidos y eclosionados (Martínez, 2002). Las variables de respuesta evaluadas para el desarrollo embrionario fueron las siguientes:

- (1) Porcentaje de división embrionaria (% División), se calculó como el número de embriones divididos con respecto al total de los ovocitos inseminados.

- (2) Porcentaje de embriones de 6 células o más (6 o más células), se calculó como el número de embriones divididos que se encontraron con 6 células con respecto al total de presuntos cigotos puestos en incubación.
- (3) Porcentaje de mórulas (% Mórulas), se calculó como el número de mórulas con respecto al total de presuntos cigotos puestos en incubación.
- (4) Porcentaje de blastocistos (% Blastocistos), se calculó como el número de blastocistos con respecto al total de presuntos cigotos puestos en incubación.

5.8 Diseño de los experimentos

Se realizaron cuatro experimentos independientes; en todos se utilizó un diseño completamente al azar. En los experimentos 2 y 4 el arreglo fue factorial 2x2; los factores fueron con o sin arginina en el medio de maduración, con y sin arginina en el medio de cultivo embrionario. En todos los medios adicionados con arginina se utilizó 0.088 mM de L-arginina HCl (Sigma Aldrich, A-5131), equivalente a 0.072 mM de arginina pura (Hong y Lee, 2007).

Experimento 1. Efecto de la administración de arginina en el medio sin BSA, sobre la maduración de ovocitos in vitro. Los COCs fueron cultivados en medio de maduración sin BSA. Se realizaron 6 repeticiones del experimento. El medio fue adicionado con (Grupo Arg (+); 72 ovocitos totales) o sin (Grupo Arg (-); 72 ovocitos totales) arginina, durante 44 horas, a 38.5 °C, con 5% CO₂. Posteriormente, los ovocitos fueron fijados y teñidos con aceto-orceína para la evaluación de la maduración nuclear.

Experimento 2. Efecto de la administración de arginina en el medio con BSA, sobre la maduración de ovocitos in vitro. Se realizaron 8 repeticiones del experimento. Los COCs fueron cultivados en medio de maduración con 0.4% (w/v) de BSA (Sigma Aldrich, A-6003). El medio fue adicionado con (Grupo BSA/Arg (+); 91 ovocitos totales) o sin (Grupo BSA/Arg (-); 88 ovocitos totales) arginina, durante 44 horas, a 38.5 °C con 5% CO₂. Posteriormente, los ovocitos fueron fijados y teñidos con aceto-orceína para la evaluación de la maduración nuclear.

Experimento 3. Efecto de la administración de arginina en los medios de maduración y de cultivo embrionario sin BSA, sobre el desarrollo embrionario temprano.

Los COCs fueron cultivados en medio de maduración sin BSA, adicionado con o sin arginina durante 44 horas, después se cultivaron en medio de fertilización. Los embriones fueron cultivados en medio de desarrollo embrionario sin BSA, suplementado con o sin arginina, durante 168 horas y fueron evaluados por observación en el microscopio invertido. Por lo tanto, en este experimento se tuvieron los siguientes grupos experimentales: 1) medio de maduración con arginina/medio de cultivo con arginina (Tratamiento Arg (+/+); 716 ovocitos totales), 2) medio de maduración con arginina/medio de cultivo sin arginina (Tratamiento Arg (+/-); 564 ovocitos totales), 3) medio de maduración sin arginina/medio de cultivo sin arginina (Tratamiento Arg (-/-); 522 ovocitos totales), 4) medio de maduración sin arginina/medio de cultivo con arginina (Tratamiento Arg (-/+); 524 ovocitos totales) (Figura 2). Se realizaron 7 repeticiones del experimento y se evaluaron las siguientes variables de respuesta: porcentajes de embriones divididos, de embriones de 6 o más células, de mórulas y de blastocistos.

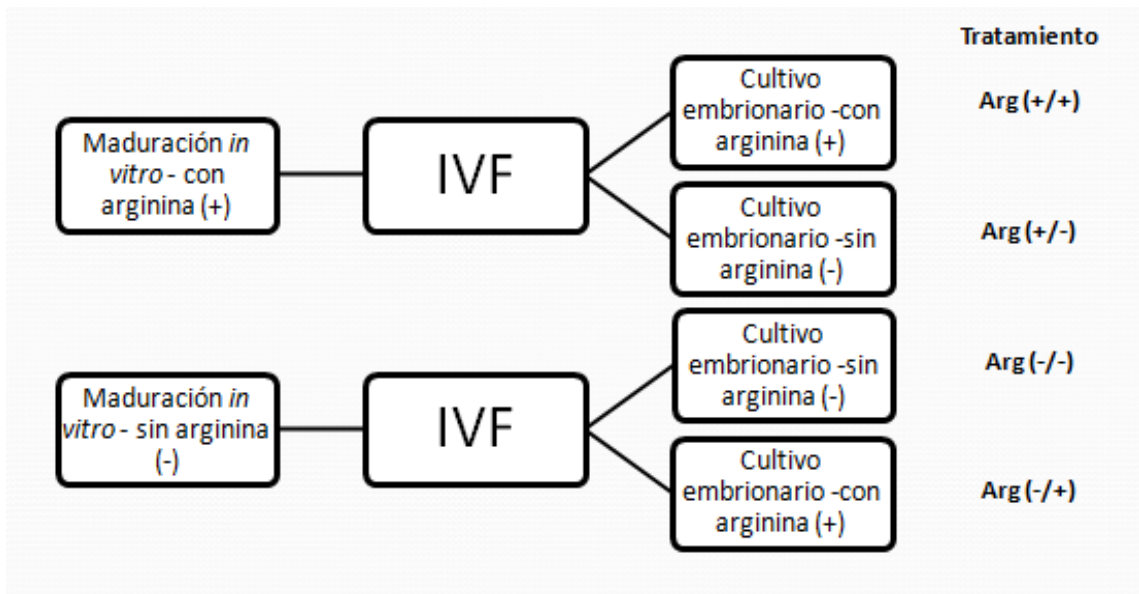


Figura 2. Tratamientos del experimento 3.

Experimento 4. Efecto de la administración de arginina en los medios de maduración y de cultivo embrionario con BSA, sobre el desarrollo embrionario temprano.

Los COCs fueron cultivados en medio de maduración con 4% de BSA, adicionado con o sin arginina durante 44 horas; después se cultivaron en medio de fertilización. Los embriones fueron cultivados en medio de desarrollo embrionario con BSA, adicionado con o sin arginina, durante 168 horas y fueron evaluados por observación en el microscopio invertido. Por lo tanto, en este experimento se tuvieron los siguientes grupos experimentales: 1) medio de maduración con arginina/medio de cultivo con arginina (Tratamiento BSA/Arg (+/+); 355 ovocitos totales), 2) medio de maduración con arginina/medio de cultivo sin arginina (Tratamiento BSA/Arg (+/-); 357 ovocitos totales), 3) medio de maduración sin arginina/medio de cultivo sin arginina (Tratamiento BSA/Arg (-/-); 360 ovocitos totales), 4) medio de maduración sin arginina/medio de cultivo con arginina (Tratamiento BSA/Arg (-/+); 358 ovocitos totales) (Figura 3). Se realizaron 6 repeticiones del experimento y se evaluaron las siguientes variables de respuesta: porcentajes de embriones divididos, de embriones de más de 6 células, de mórulas y de blastocistos.

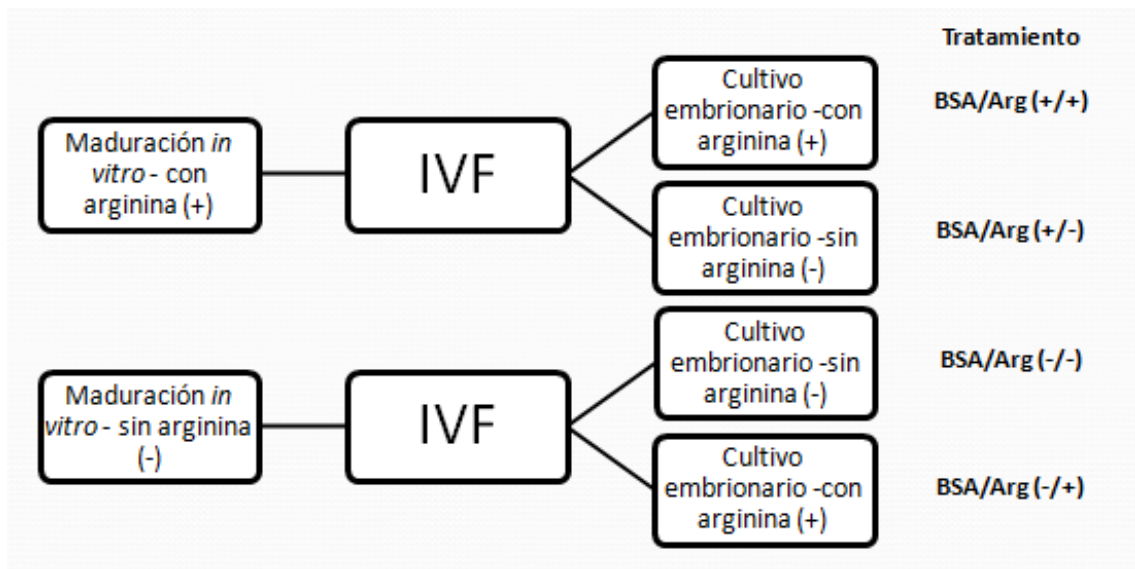


Figura 3. Tratamientos del experimento 4.

5.9 Análisis estadísticos

Los datos se sometieron a análisis de varianza, para un diseño completamente al azar (en los experimentos 2 y 4, con arreglo factorial 2x2; los factores fueron con o sin arginina en el medio de maduración, con y sin arginina en el medio de cultivo embrionario). Se utilizó el procedimiento GLM (SAS). Para cumplir con los supuestos del análisis de varianza, previo a los análisis, los datos expresados como proporciones (p) fueron transformados a su arco seno (\sqrt{p}); posteriormente se re-transformaron a los valores reales y expresados como porcentajes en los cuadros y figuras de resultados.

6. RESULTADOS

6.1 Experimento 1. Efecto de la administración de arginina en el medio sin BSA, sobre la maduración de ovocitos *in vitro*.

La adición de arginina al medio sin BSA favoreció la maduración ($P= 0.006$; Figura 4), al producir un mayor porcentaje de ovocitos maduros ($52.3 \pm 4.1 \%$) comparado con el grupo testigo ($31.3 \pm 4.4 \%$).

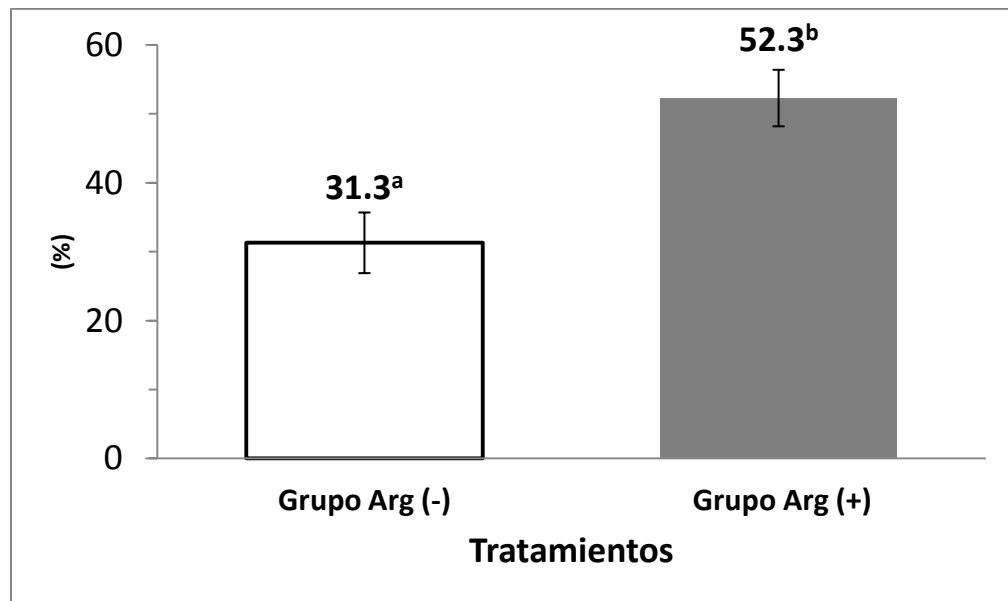


Figura 4. Efecto de la administración de arginina en el medio sin BSA sobre el porcentaje de maduración de ovocitos *in vitro*. El gráfico presenta los porcentajes promedio. Las diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P=0.006$).

6.2 Experimento 2. Efecto de la administración de arginina en el medio con BSA, sobre la maduración de ovocitos *in vitro*.

La adición de arginina al medio con BSA favoreció la maduración ($P= 0.006$; Figura 5), al producir un mayor porcentaje de ovocitos maduros ($72 \pm 2.1 \%$) comparado con el grupo testigo ($63 \pm 3.8 \%$).

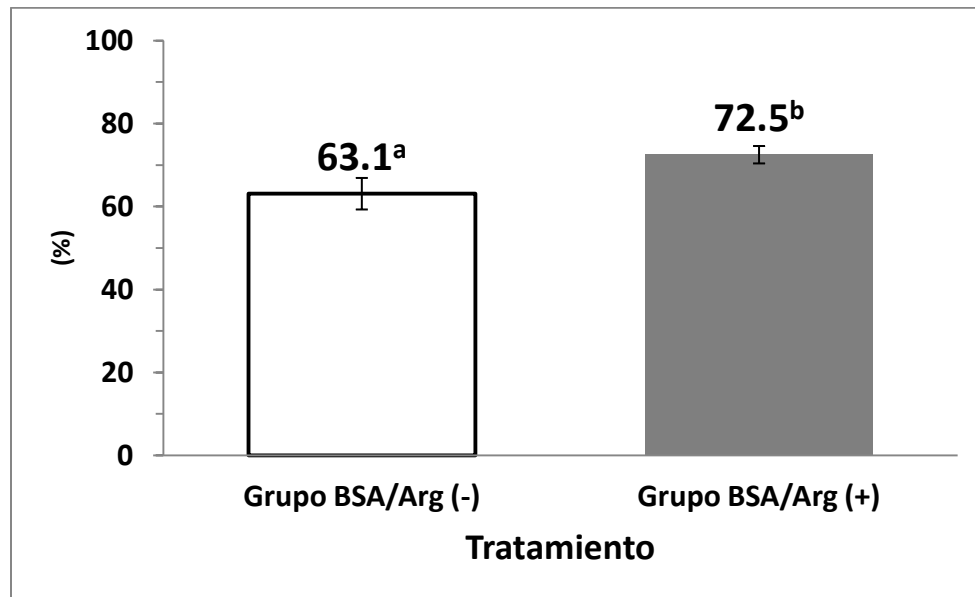


Figura 5. Efecto de la administración de arginina en el medio con BSA sobre el porcentaje de maduración de ovocitos *in vitro*. El gráfico presenta los porcentajes promedio. Las diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P=0.006$).

6.3 Experimento 3. Efecto de la administración de arginina en los medios de maduración y de cultivo embrionario sin BSA, sobre el desarrollo embrionario temprano.

La interacción de la adición de arginina al medio de maduración x la adición en el medio de cultivo embrionario no fue significativa para ninguna de las variables de respuesta (Cuadro 4). Sin embargo, la adición de arginina en el medio de cultivo embrionario tuvo efectos favorables en los porcentajes de división embrionaria ($P=0.016$), de embriones de más de 6 células ($P=0.004$) y de mórulas ($P=0.003$; Cuadro 5). La adición de arginina en el medio de

maduración tendió a favorecer el porcentaje de mórulas obtenidas ($P=0.118$). Sólo cuando se adicionó la arginina en los medios de maduración y de cultivo embrionario, se logró alcanzar el estadio de blastocisto. El tratamiento al que se le adiciono arginina en el medio de maduración y en el medio de cultivo embrionario, tuvo efectos significativos sobre todas sobre las variables comparado con los tratamientos a los que no se le adiciono arginina en el medio de cultivo. El tratamiento al que sólo se le adiciono arginina en el medio de cultivo embrionario se mostró intermedio para todas las variables estudiadas.

Cuadro 4. Efecto de la administración de arginina en medios sin BSA sobre el desarrollo embrionario temprano.

Variables	Tratamiento				Valor de <i>P</i>
	Arg (+/+)	Arg (+/-)	Arg (-/-)	Arg (-/+)	*M x D
División embrionaria	27.6 ± 4.0 ^a	10.6 ± 2.4 ^b	12.5 ± 4.2 ^b	17.6 ± 4.6 ^{ab}	0.310
Más de 6 células	19.9 ± 4.2 ^a	5.6 ± 1.6 ^b	6.6 ± 2.2 ^b	12.1 ± 3.0 ^{ab}	0.328
Mórulas	12.5 ± 3.0 ^a	2.9 ± 0.9 ^b	2.4 ± 1.0 ^b	7.3 ± 2.4 ^{ab}	0.500
Blastocistos	0.8 ± 0.3	0	0	0	0.014

* M x D = Interacción de la adición de arginina en el medio de maduración x adición de arginina en el medio de desarrollo embrionario. Las diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P<0.05$).

Cuadro 5. Efecto de la administración de arginina en medio de maduración y medio de cultivo embrionario sin BSA sobre el desarrollo embrionario temprano.

Variables	Efecto de Arginina en medio de:							
	Maduración				Cultivo embrionario			
	Arg (+)	Arg (-)	EEM	P	Arg (+)	Arg (-)	EEM	P
División embrionaria	19.1	14.3	2.7	0.206	22.2	10.8	2.7	0.016
Más de 6 células	12.8	9.0	2.1	0.214	16.0	5.9	2.1	0.004
Mórulas	7.7	4.7	1.4	0.118	9.9	2.5	1.4	0.003
Blastocistos	0.4	0	0.1	0.014	0.4	0	0.1	0.014

6.4 Experimento 4

Efecto de la administración de arginina en los medios de maduración y de cultivo embrionario con BSA, sobre el desarrollo embrionario temprano. La interacción de la adición de arginina en el medio de maduración x la adición de arginina en el medio de desarrollo embrionario no fue significativa para ninguna de las variables evaluadas en el experimento 4 (Cuadro 6). Al analizar los efectos principales, se observó que la suplementación de arginina en ambas etapas, maduración o cultivo embrionario, no tuvo efecto significativo en ninguna de las variables (Cuadro 7); sólo se observó una tendencia favorable cuando se adicionó arginina en la maduración, sobre el porcentaje de embriones de 6 células ($P=0.13$), y de la arginina en el medio de maduración, sobre el porcentaje de mórulas ($P=0.10$).

Cuadro 6. Efecto de la administración de arginina en medios con BSA sobre el desarrollo embrionario temprano.

Variables	Tratamiento %				Valor de <i>P</i>
	BSA Arg (+/+)	BSA Arg (+/-)	BSA Arg (-/-)	BSA Arg (-/+)	*M x D
División embrionaria	55.3 ± 8.6	48.6 ± 5.0	45.6 ± 7.0	49.3 ± 6.6	0.79
Más de 6 células	40.0 ± 6.6	31.8 ± 2.9	26.6 ± 5.5	29.4 ± 4.8	0.71
Mórulas	24.8 ± 5.6	16.8 ± 2.6	11.6 ± 2.5	19.4 ± 4.8	0.97
Blastocistos	3.4 ± 0.9	3.1 ± 0.5	2.2 ± 0.6	3.1 ± 0.9	0.59

*M x D = Interacción de la adición de arginina en el medio de maduración x adición de arginina en el medio de desarrollo embrionario.

Cuadro 7. Efecto de la administración de arginina en medio de maduración y medio de cultivo embrionario con BSA sobre el desarrollo embrionario temprano.

Variables	Efecto de Arginina en medio de:							
	Maduración				Cultivo embrionario			
	BSA Arg (+)	BSA Arg (-)	EEM	<i>P</i>	BSA Arg (+)	BSA Arg (-)	EEM	<i>P</i>
División embrionaria	52.0	47.4	4.9	0.50	52.3	47.1	4.9	0.46
Más de 6 células	36.0	28.0	3.6	0.13	34.7	29.2	3.6	0.33
Mórulas	20.5	15.5	3.0	0.23	22.1	14.0	3.0	0.10
Blastocistos	3.3	2.6	0.5	0.41	3.3	2.6	0.5	0.78

7. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se determinó el efecto de la arginina durante los procesos de maduración de ovocitos y el desarrollo temprano de embriones porcinos obtenidos *in vitro*. Los ovocitos al igual que los embriones fueron cultivados en condiciones libres de BSA para los experimentos 1 y 3, con lo que se procuró que los medios estuvieran libres de proteína y proporcionando medios químicamente definidos. En los experimentos 2 y 4 se cultivaron los ovocitos y los embriones en medios que contenían 0.4% de BSA, proporcionando medios químicamente semidefinidos.

Durante el experimento 1, se observó el 52.3% de maduración (Figura 4) con respecto a otros trabajos que obtuvieron del 75 al 96% de maduración en ovocitos porcinos utilizando fluido folicular porcino en el medio NCSU-23, el NCSU-37 y el TCM-199 (Almiñana et al., 2008; Yoshioka et al., 2008; Yuan y Krisher, 2010), esto podría explicarse debido a la falta de diversos factores asociados a la maduración que se encuentran en el fluido folicular porcino, entre ellos la fuente proteica, de aminoácidos, de vitaminas y de factores de crecimiento. Se ha mostrado que los ovocitos porcinos pueden ser madurados (45 al 89%) en un medio libre de proteínas con posterior fertilización y desarrollo embrionario *in vitro* (Abeydeera et al., 1998a; Hong y Lee, 2007). Sin embargo, la habilidad del desarrollo embrionario cuando se utilizan estas condiciones en la maduración no está muy estudiada. Los ovocitos madurados *in vitro* en condiciones libres de BSA suplementados con arginina, tuvieron un porcentaje de maduración significativamente más elevado que el grupo sin arginina (Figura 4). Estos resultados indican que la adición de la arginina está influyendo en la maduración de los ovocitos de cerdo *in vitro* en medios con condiciones libres de proteína, posiblemente debido a la correlación que tienen los metabolitos de la arginina, como el óxido nítrico y poliamidas con la maduración del ovocito. Las poliamidas pueden influir en la restauración meiótica de la maduración de los ovocitos a través de la regulación de canales iónicos (Coburn, 2009), otras investigaciones indican que las poliaminas son esenciales para la maduración citoplasmática y no permiten la apoptosis (Zhou et al., 2009). También se ha demostrado que el óxido nítrico juega un papel crucial durante la maduración meiótica, especialmente en el rompimiento de la

vesícula germinal y la emisión del primer cuerpo polar en ratones (Huo et al., 2005) al igual que en cerdos (Hattori et al., 2001; Tao et al., 2005). La acción que tiene óxido nítrico sobre la maduración del ovocito podría ser a través de mediar la función de las células de cúmulus que rodean al ovocito (Tao et al., 2005), regulando los niveles de cAMP en el ovocito, por incremento en la síntesis de cGMP (Jablonka-Shariff y Olson, 1998), o a través de vías no dependientes de cGMP, tal como la activación directa de los canales iónicos, la MAPK, las proteínas G, y las protein tirosin cinasas (Bioldeau-Goeseels, 2007).

La arginina pudiese haber mejorando los índices de maduración debido al cGMP por regulación de cAMP. Sin embargo, esta vía podría no tener un efecto importante en la maduración *in vitro*, ya que se ha observado que los ovocitos pueden madurar automáticamente cuando son retirados de su folículo debido a que bajan las concentraciones de cAMP (Kubelka et al., 2000).

Por otro lado las diferencias mostradas en la maduración de los ovocitos cuando se cultivaron en un medio de maduración con y sin arginina podrían deberse a las condiciones subóptimas que presentaban los medios libres de proteínas, de esta manera en un medio subóptimo, la adición de arginina pudo haber mejorado los porcentajes de maduración debido a que mejoró las condiciones del medio para el proceso de maduración y no a un efecto directo sobre la maduración, ya que los aminoácidos pueden actuar de varias maneras, como osmoreguladores (Palacin et al., 1998), buffers intracelulares (Edwards et al., 1998), quelantes de metales pesados y substratos de energía (Rose-Hellekante et al., 1998).

En cuanto al experimento 2, se observaron porcentajes más elevados de maduración cuando se administra arginina (Figura 5) con respecto a los obtenidos durante el experimento 1, probablemente debido a que el medio de maduración suplementado con 0.4% de BSA se acerca más a los requerimientos óptimos necesarios durante la maduración. Los resultados obtenidos durante este experimento cuando se adiciona arginina al medio de maduración son similares a los obtenidos en otros trabajos del 75 al 96% de maduración en porcinos (Almiñana et al., 2008; Yoshioka et al., 2008; Yuan y Krisher, 2010).

Cuando se utiliza un medio semi-definido, suplementado con BSA y se busca observar el efecto de la arginina sobre la maduración de los ovocitos porcinos *in vitro*, pueden existir efectos confundidos, ya que la suplementación con BSA aporta arginina al medio, por tal motivo la adición de la arginina al medio podría no tener efecto sobre la maduración o en caso de tenerlo quizá pueda ser debido a la arginina contenida en la BSA. Considerando lo anterior, los ovocitos de porcino madurados *in vitro* en medio suplementado con BSA y arginina, tuvieron un porcentaje de maduración significativamente más elevado que el grupo al que no se le administró la arginina (Figura 5). Los resultados obtenidos indican que la adición de la arginina mejora la maduración de los ovocitos porcinos *in vitro* en un medio semi-definido suplementado con BSA, sugiriendo que la BSA suplementada al medio no cubre todos los requerimientos de arginina.

En cuanto al experimento 3 se observó que no existe una interacción entre el medio de maduración y el de cultivo embrionario cuando se les administra o no arginina (Cuadro 4). Sin embargo la administración de arginina en el medio de cultivo embrionario tuvo efectos favorables sobre las variables del desarrollo embrionario. Sin importar si fue adicionada o no en el medio de maduración evaluadas (Cuadro 5). Esto pudo deberse a la participación de óxido nítrico y las poliamidas, ya que se ha reportado que participan en el desarrollo embrionario (Gouge et al., 1998; Sengoku et al., 2001; Lefèvre et al., 2011). Se ha observado que las poliaminas participan en la embriogénesis temprana en ratones (Domashenko et al., 1997) y en cerdos (Cui y Kim, 2005). Muzikova y Clark (1995) mostraron un mayor índice de desarrollo hasta blastocistos *in vitro* cultivados con poliamidas. Tranguch et al. (2003) mostraron que el óxido nítrico participa en la regulación del desarrollo embrionario, al menos vía cGMP. Sin embargo no se puede descartar la posibilidad de que óxido nítrico trabaje no sólo a través de cGMP, sino que involucre otras vías como fosfodiesterasas o proteínas G (Bioldeau-Goeseels, 2007). Además se ha demostrado que bajas concentraciones de óxido nítrico durante el desarrollo embrionario pueden retárdalo o inhibirlo y que altas concentraciones pueden degenerar los embriones (Tranguch et al., 2003).

La adición de la arginina en el medio de maduración no tuvo efecto sobre el desarrollo embrionario, posiblemente debido a las condiciones subóptimas (libre de proteínas) que presentaba el medio, ya que el ovocito durante la maduración debe someterse a un complejo reordenamiento citoplasmático que le permita soportar la fertilización y el desarrollo posterior. Además, la síntesis de proteína es indispensable no sólo para la maduración del ovocito, también para el desarrollo del embrión (Ferreira et al., 2009). Por lo cual, las condiciones del medio de maduración pueden causar que un gran porcentaje de ovocitos no alcancen una maduración completa. Esto puede hacerse evidente en los bajos índices de desarrollo embrionario después de la IVF (Gil et al., 2010). Ciertamente esto se muestra en los bajos índices obtenidos de embriones divididos, embriones de 6 o más células, mórulas y blastocistos (Cuadro 4). Por otro lado, en el experimento 1 se obtuvieron mayores porcentajes de ovocitos maduros al adicionar la arginina al medio. Este mayor porcentaje de ovocitos maduros se reflejó en mayores porcentajes para todas las variables estudiadas durante el experimento 2 cuando se adiciono arginina en el medio de maduración y el de cultivo embrionario; este fue el único tratamiento en el que se obtuvieron algunos embriones en el estadio de blastocisto, mostrando que se requieren de buenos índices de maduración para mejorar los índices de desarrollo embrionario.

Posiblemente la adición de arginina a los medios de cultivo puede mejorar el sistema de producción *in vitro* a través de sus metabolitos, como se ha observado en otros trabajos (Tranguch et al., 2003; Tao et al., 2005; Lefèvre et al., 2011). También las diferencias cuando se suplemento con arginina en el medio de maduración y cultivo embrionario con respecto a los demás tratamientos pueden deberse a las condiciones subóptimas del medio el cual era libre de proteínas y al tener los cuatro tratamientos las mismas condiciones, el adicionar la arginina en los dos medios del tratamiento, sugiere la mejora de las condiciones durante la maduración y el cultivo embrionario. Hong et al. (2004) mencionan que diferentes aminoácidos como el aspartato, la alanina, la arginina, la glutamina y la prolina, pueden incrementar los índices de formación de pronúcleos y blastocistos porcinos en medios libres de proteína.

Durante el experimento 4 no se observaron interacciones entre los medios suplementados con BSA de maduración y de cultivo embrionario complementados con y sin arginina. El efecto de la adición de la arginina en el medio de maduración y el medio de cultivo embrionario no fue significativo. La presentación comercial de BSA utilizada está compuesta de diversos factores, como proteínas, aminoácidos y sustratos energéticos (96% pureza), estos factores al agregarse a los medios a través de la BSA, pueden mejorar las condiciones para el cultivo de ovocitos y embriones, y tener efectos sobre la maduración y el desarrollo embrionario *in vitro*. Pemble y Kaye (1986), han sugerido que la adición de proteínas como la BSA al medio de cultivo puede ser esencial, ya que el embrión puede captarlas por endocitosis y romperlas, obteniendo sustratos energéticos y aminoácidos para sus procesos metabólicos y anabólicos. Por lo cual, nosotros al generar las mismas condiciones para todos los tratamientos y agregar arginina en los medios, no obtuvimos efectos significativos en el experimento 4, quizá debido a que los requerimientos de arginina de los ovocitos y los embriones durante la maduración y el desarrollo embrionario ya estaban cubiertos por la BSA. Sin embargo los porcentajes de desarrollo embrionario son bajos comparados con los obtenidos en otros trabajos donde obtuvieron 6% de blastocistos en un medio de cultivo embrionario libre de glucosa, adicionado con piruvato y lactato de sodio (Hong y Lee, 2007). Yuan y krisher (2010), obtuvieron 11% de blastocistos utilizando medio TCM 199 suplementado con fluido folicular porcino durante la maduración.

Las concentraciones administradas de arginina (0.08 mM) en los medios durante este trabajo, fueron tomadas de Hong y Lee (2007) y corresponden a las concentraciones encontradas en el líquido folicular porcino. Sin embargo se han encontrado diferentes cantidades de arginina en fluido oviductual de porcino en el día 3 después del estro (1.69 mM) y en fluido uterino en el día 3 después del estro (0.59 mM) (Li et al., 2007). Los requerimientos nutricionales de los embriones, no son iguales en los estadios de división que en los de diferenciación (mórula y blastocisto), como se ha demostrado en numerosos estudios (Robl y Davis, 1981; Meyen et al., 1989; Gardner et al., 1994; Hochi et al., 1994). Esto pudo afectar durante el cultivo embrionario *in vitro* que se realizó durante este trabajo, debido a que las concentraciones de arginina administradas en los medios durante este

periodo corresponden a las concentraciones para un medio de maduración y podrían ser menores a las requeridas durante el desarrollo embrionario. Por tal motivo, el desarrollo de los embriones hasta los estadios de mórulas y de blastocistos pudo haberse afectado, aunado a un bajo rendimiento de la maduración y a las condiciones subóptimas de los medios.

Es necesario realizar más experimentos que incluyan el efecto de diversas concentraciones de arginina durante la maduración de los ovocitos y el cultivo de embriones porcinos, para determinar las cantidades óptimas para cada medio; estas pruebas deberán realizarse preferentemente con suplementación de aminoácidos dentro de medios químicamente definidos, para descartar la utilización de medios subóptimos y poder observar claramente el efecto de la arginina durante el proceso de producción de embriones porcinos *in vitro*.

8. CONCLUSIONES

La adición de arginina en el medio de maduración, tuvo efectos favorables sobre la maduración *in vitro* de los ovocitos porcinos en condiciones subóptimas, libres de proteína.

La adición de arginina, tuvo efectos favorables sobre el desarrollo *in vitro* de embriones porcinos en condiciones subóptimas, libres de proteína. El efecto principalmente se observó cuando se adicionó arginina en el medio de cultivo embrionario.

La adición de arginina en los medios de cultivo suplementados con BSA tiene efectos favorables sobre la maduración de los ovocitos, y no así sobre el desarrollo temprano de embriones porcinos.

Es necesario realizar más investigaciones, para determinar las concentraciones necesarias para cada medio utilizado dentro de la producción *in vitro* de embriones porcinos, lo cual ayudaría a mejorar los medios químicamente definidos y, por lo tanto, también en la eficiencia de las técnicas.

9. LITERATURA CITADA

1. Abeydeera, L.R. And B.N. Day. 1997. *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified Trisbuffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology*. 48: 537-544.
2. Abeydeera, L.R., W. Wang, R.S. Prather and B.N. Day. 1998a. Maturation in vitro of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development in vitro. *Biology of Reproduction*. 58: 1316-1320.
3. Abeydeera, L.R., W.H. Wang, T.C. Cantley, A. Rieke and B.N. Day. 1998b. Coculture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after *in vitro* fertilization: relevance to intracellular glutathione. *Biology of Reproduction*. 58: 213-218.
4. Abeydeera, L.R. 2002. *In vitro* production of embryos in swine. *Theriogenology*. 57: 257-273.
5. Agung, B., Y. Piao, D. Fuchimoto, S. Senbon, A. Onishi, T. Otoi, and T. Nagai. 2010. Effects of oxygen tension and follicle cells on maturation and fertilization of porcine oocytes during in vitro culture in follicular fluid. *Theriogenology*. 73: 893– 899.
6. Ajduk, A., and M. Zernicka-Goetz. 20013. Quality control of embryo development. *Molecular Aspects of Medicine*. 34: 903-918.
7. Alexandre, H. 1978. Effect of inhibitors of polyamine biosynthesis on primary differentiation of mouse egg. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l Academie des Sciences. D: Sciences Naturelles*. 286:1215–1217.
8. Alm, K. and S. Oredsson. 2009. Cells and polyamines do it cyclically. *Essays in Biochemistry*. 46:63–76.
9. Almiñana, C., M.A. Gil, C. Cuello, I. Caballero, J. Roca, J.M. Vazquez, E. Gomez and E.A. Martinez. 2008. In vitro maturation of porcine oocytes with retinoids improves embryonic development. *Reproduction, Fertility and Development*. 20: 483–489.
10. Bastida, C.M., F. Tejada, A. Cremades and R. Peñafiel. 2002. The preovulatory rise of ovarian ornithine decarboxylase is required for progesterone secretion by the corpus luteum. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 293:106–111.
11. Bastida, C.M., A. Cremades, M.T. Castells, A.J. López, C. López, F. Tejada and R. Peñafiel. 2005. Influence of ovarian ornithine decarboxylase in folliculogenesis and luteinization. *Endocrinology* 146:666–674.

12. Bavister, B.D. 1989. A consistently successful procedure for *in vitro* fertilization of golden hamster eggs. *Molecular Reproduction and Development*. 23:139-158.
13. Bavister, B.D. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reproduction*. 1: 91-148.
14. Ben-Yosef, D. and R. Shalgi. 2001. Oocyte activation: lesson from human infertility. *Trends in Molecular Medicine*. 7(4): 163-169.
15. Berwanger, A., S. Eyrisch, I. Schuster, V. Helms and R. Bernhardt. 2010. Polyamines: naturally occurring small molecule modulators of electrostatic protein-protein interactions. *Journal of Inorganic Biochemistry* 104:118–125.
16. Bilodeau-Goeseels, S. 2007. Effects of manipulating the nitric oxide/cyclic GMP pathway on bovine oocyte meiotic resumption *in vitro*. *Theriogenology*. 68:693-701.
17. Bird, I.M., L.B. Zhang and R.R. Magness. 2003. Possible mechanisms underlying pregnancy-induced changes in uterine artery endothelial function. *American Journal of Physiology*. 284: R245–R258.
18. Blachier, F., H. M'Rabet-Touil, L. Posho, B. Darcy-Vrillon and P.H. Duée. 1993. Intestinal arginine metabolism during development. Evidence for *de novo* synthesis of L-arginine in newborn pig enterocytes. *European Journal of Biochemistry*. 216(1): 109-117.
19. Brevini, T.A.L., F. Cillo, S. Antonini and F. Gandolfi. 2007. Cytoplasmic remodelling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. *Animal Reproduction Science*. 98:23-38.
20. Bu, S., G. Xia, Y. Tao, L. Lei and B. Zhou. 2003. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes *in vitro*. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 207:21-30.
21. Burnett, A.L., D.D. Richer, S.L. Chamness, M.P. Maguire, J.K. Crone, D.S. Bredt, S.H. Snyder and T.S. Chang. 1995. Localization of nitric oxide synthase in the reproductive organs of the male rat. *Biology of Reproduction*. 52:1–7.
22. Calandra, R.S., S.B. Rulli, M.B. Frungieri, M.O. Suescun, and S.I. González-Calvar. 1996. Polyamines in the male reproductive system. *Acta Physiologica Pharmacologica et Therapeutica Latinoamericana*. 46:209–222.
23. Casillas, E.R., C.M. Elder and D.D. Hoskins. 1980. Adenylate cyclase activity of bovine spermatozoa during maturation in the epididymis and the activation of sperm particulate adenylate cyclase by GTP and polyamines. *Journal of Reproduction and Fertility* 59:297–302.

24. Castillo, L., T.E. Chapman, Y.M. Yu, A. Ajami, J.F. Burke and V.R. Young. 1993. Dietary arginine uptake by the splanchnic region in adult humans. *American Journal of Physiology*. 265: 532-539.
25. Childs, A.C., D.J. Mehta and E.W. Gerner. 2003. Polyamine-dependent gene expression. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 60: 1394–1406.
26. Coburn, R.F. 2009. Polyamine effects on cell function: possible central role of plasma membrane PI(4,5)P2. *Journal of Cellular Physiology*. 221:544–551.
27. Coleman, C. S., G. Hu and A.E. Pegg. 2004. Putrescine biosynthesis in mammalian tissues. *Biochemical Journal*. 379: 849–855.
28. Coy, P., E. Martínez, S. Ruiz, J.M. Vázquez, J. Roca y C., Matas. 1993. Sperm concentration influences fertilization and male pronuclear formation *in vitro* in pigs. *Theriogenology*. 40: 539-546.
29. Cran, D.G. 1985. Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. *Journal of Reproduction and Fertility*. 74: 237-245.
30. Cui, X.S. and N.H. Kim. 2005. Polyamines inhibit apoptosis in porcine parthenotes developing *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*. 70:471–477.
31. Curis, E., I. Nicolis and C. Moinard. 2005. Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids*. 29:177–205.
32. Davis, D.L. 1985. Culture and storage of pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*. 33: 115-124.
33. De los Reyes, M., J. Palomino, V.H. Parraguez, M. Hidalgo and P. Saffie. 2011. Mitochondrial distribution and meiotic progression in canine oocytes during *in vivo* and *in vitro* maturation. *Theriogenology*. 75:346-353.
34. Dey, S.K., R. Kimura, F. Mukherjee and Z.J. Dickmann. 1978. Cyclic-AMP and cyclic-GMP in rabbit blastocysts. *Reproduction and Fertility*. 52:235-237.
35. Dhanakoti, S.N., J.T. Brosnan, G.R. Herzberg and M.E. Brosnan. 1990. Renal arginine synthesis: studies *in vitro* and *in vivo*. *American Journal of Physiology*. 259: 437-442.
36. Dobrinsky, J.R., L.A. Johnson, LA and D. Rath. 1996. Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. *Biology of Reproduction*. 55: 1069-1074.

37. Domashenko, A.D., K.E. Latham KE and K.S. Hatton. 1997. Expression of myc-family, myc-interacting, and myc-target genes during preimplantation mouse development. *Molecular Reproduction and Development*. 47:57–65.
38. Dubey, P.K., V. Tripathi, R.P. Singh, and G. Sharma. 2011. Influence of nitric oxide *in vitro* growth, survival, steroidogenesis, and apoptosis of follicle stimulating hormone stimulated buffalo (*Babalus bubalis*) preantral follicles. *Journal of Veterinary Science*. 12:257-265.
39. Edwards, L.J., D.A. Williams and D.K. Gardner. 1998. Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffer of intracellular pH. *Human Reproduction*. 13:3441–3448.
40. Ehren, I., J. Adolfsson and N.P. Wiklund. 1994. Nitric oxide synthase activity in the human urogenital tract. *Urological Research*. 22:287–290.
41. Ellederova, Z., H. Kovarova, F. Melo-Sterza, M. Livingstone, W. Tomek, and M. Kubelka. 2006. Suppression of translation during *in vitro* maturation of pig oocytes despite enhanced formation of cap-binding protein complex eIF4F and 4E-BP1 hyperphosphorylation. *Molecular Reproduction and Development*. 73:68-76.
42. Exley, G.E. and M.W. Carol. 1999. Zygotic Genomic Activation. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA. 4: 1041-1046.
43. Ferreira, E.M., A.A. Vireque, P.R. Adona, F.V. Meirelles, R.A. Ferriani and P.A.A.S. Navarro. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Teheriogenology*. 71:836-848.
44. Fetterolf, P.M., A. Jurisicova, J.E. Tyson JE and R.F. Casper RF. 1994. Conditioned medium from human cumulus oophorus cells stimulates human sperm velocity. *Biology of Reproduction*. 51: 184–192
45. Fleidervish, I. A., L. Libman, E. Katz and M.J. Gutnick. 2008. Endogenous polyamines regulate cortical neuronal excitability by blocking voltage-gated Na⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105: 18994–18999.
46. Flint, A.P.F. 1981. An unifying hypothesis for the control of blastocyst growth based on observations on the pig. *Journal of Reproduction and Fertility*. 29: 215-227
47. Flynn, N.E., C.J. Meininger, T.E. Haynes and G.Wu. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed Pharmacother* 2002; 56:427–38.

48. Fulka-Jr, J., N.L. First and R.M. Moor. 1998. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Molecular Human Reproduction*. 4:41–9.
49. Funahashi, H., T.C. Cantley, T.T. Stumpf, S.L. Terlouw and B.N. Day. 1994. Use of low-salt culture medium for *in vitro* maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after *in vitro* fertilization. *Biology of Reproduction*. 51: 633-639.
50. Funahashi, H. and T. Nagai. 2001. Regulation of *in vitro* penetration of frozen-thawed boar spermatozoa by caffeine and adenosine. *Molecular Reproduction and Development*. 58: 424–431.
51. García, R.E., F.P. Coy, Matas, P.C. 2005. Análisis de diferentes factores que afectan al rendimiento de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en la especie porcina. Tesis de Doctorado. Universidad de Murcia. Departamento de Fisiología Y Farmacología.
52. Gardner, D.K., M. Lane, A. Spitzer and P.A. Batt. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acid, vitamins and culturing embryos in groups stimulate development. *Biology of Reproduction*. 50: 390-400.
53. Gil, M.A.C. 2001. Influencia de diferentes condiciones de cocultivo sobre la fecundación y la producción *in vitro* de embriones porcinos. Tesis de Doctorado. Universidad de Murcia, España.
54. Gil, M.A., M. Ruiz, J.M. Vázquez, J. Roca, B.N. Day and E.A. Martínez. 2004. Effect of short periods of sperm–oocyte coincubation during *in vitro* fertilization on embryo development in pigs. *Theriogenology*. 62: 544–552.
55. Gil, M.A., C. Almiñana, C. Cuello, I. Parrilla, J. Roca, J.M. Vázquez, and E.A. Martínez. 2007. Brief coincubation of gametes in porcine *in vitro* fertilization: Role of sperm: oocyte ratio and post-coincubation medium. *Theriogenology*. 67: 620– 626.
56. Gil, M.A., C. Cuello, I. Parrilla, J.M. Vázquez, J. Roca, and E.A. Martínez. 2010. Advances in swine *in vitro* embryo production technologies. *Reproduction in Domestic Animals*. 45:40-48.
57. Gouge, R.C., P. Marshburn, B.E. Gordon, W. Nunley and Y.M. Huet-Hudson. 1998. Nitric oxide as a regulator of embryonic development. *Biology of Reproduction*. 58:875–879.

58. Guha, S.K. and J. Jänne. 1976. The synthesis and accumulation of polyamines in reproductive organs of the rat during pregnancy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 437:244–252.
59. Hao, Z.D., S. Liu, Y. Wu, P.C. Wan, M.S. Cui, H. Chen and S.M. Zeng. 2009. Abnormal changes in mitochondria, lipid droplets, ATP and glutathione content, and Ca^{2+} release after electro-activation contribute to poor developmental competence of porcine oocyte during in vitro ageing. *Reproduction, Fertility and Development*. 21:323–32.
60. Harris, J.D., D.W. Hibler, G.K. Fontenot, K.T. Hsu, E.C. Yurewicz and A.G. Sacco. 1994. Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB, and ZPC gene families. *DNA Sequence*. 4: 361-393.
61. Hattori, M-A., N. Nishida, K. Takesue, Y. Kato, and N. Fujihara. 2000. FSH suppression of nitric oxide synthesis in porcine oocytes. *Journal of Molecular Endocrinology*. 24:65-73.
62. Hattori, M-A., K. Takesue, Y. Kato and N. Fujihara. 2001. Expression of endothelial nitric oxide Synthase in the porcine oocyte and its possible fuction. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 219: 121-126.
63. Heby, O. 1995. DNA methylation and polyamines in embryonic development and cancer. *The International Journal of Development Biology*. 39:737–757.
64. Heidari Amele, M., A. Zare Shahne, A. Abavisani, and S. Nasrollahi. 2011. Effects of inhibiting nitric oxide synthase on cumulus expansion and nuclear maturation of sheep oocyte. *Czech Journal of Animal Science*. 56:284-291.
65. Herrero, M.B., S. Perez-Martinez, J.M. Viaggiano, J.M. Polak and M.F. Gimeno. 1996. Localization by indirect immunofluorescence of nitric oxide synthase in mouse and human spermatozoa. *Reproduction Fertility and Development*. 8:931–934.
66. Herrero, M.B., J.M. Viggiano, S. Perez-Martinez and M.F. Gimeno. 1997. Evidence that nitric oxide synthase is involved in progesterone-induced acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *Reproduction Fertility and Development*. 9:433–439.
67. Herrero, M.B., S. Chatterjee, L. Lefievre, E. De Lamirande and C. Gagnon. 2000. Nitric oxide interacts with the cAMP pathway to modulate capacitation of human spermatozoa. *Free Radical Biology and Medicine*. 29:522–536.

68. Ho, H. and S.S. Suarez. 2001. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction*. 122: 519–526.
69. Hochi, S.I., J. Braun, Miyamoto, Y. Fukui and N. Oguri. 1994. Influence sera on *in vitro* hatching of equine blastocysts. *Journal of Reproduction and Development*. 40: 13-18.
70. Hong, J.Y., H.Y. Yong, B.C. Lee, W.S. Hwang, J.M. Lim and E.S. Lee. 2004. Effects of amino acids on maturation, fertilization and embryo development of pig follicular oocytes in two IVM media. *Theriogenology*. 62: 1473-1482.
71. Hong, J., and E. Lee. 2007. Intrafollicular amino acid concentration and the effect of amino acids in a defined maturation medium on porcine oocyte maturation, fertilization, and preimplantation development. *Theriogenology*. 68:728-735.
72. Huang, Y., L.J. Marton, P.M. Woster and R.A. Casero. 2009. Polyamine analogues targeting epigenetic gene regulation. *Essays in Biochemistry* 46:95–110.
73. Hunter, R.H.F. 1974. Chronological and cytological details of fertilization and early embryonic development in the domestic pig. *The Anatomical Record*. 178: 169-186.
74. Hunter, R.H.F. 1991. Behaviour of spermatozoa in the oviduct of farm animals. *Archivos de Biología y Medicina Experimentales*. 24:349-359.
75. Huo, L.J., C.G. Liang, L.Z. Yu, Z.S. Zhong, Z.M. Yang, H.Y. Fan, D.Y. Chen, and Q.Y. Sun. 2005. Inducible nitric oxide regulates germinal vesicle breakdown and first polar body emission in the mouse oocyte. *Reproduction Research*. 129:403-409.
76. Hyvönen, M.T., T.A. Keinänen, M. Cerrada-Gimenez, R. Sinervirta, N. Grigorenko, A.R. Khomutov, J. Vepsäläinen, L. Alhonen and J. Jänne. 2007. Role of hypusinated eukaryotic translation initiation factor 5A in polyamine depletion-induced cytostasis. *The Journal of Biological Chemistry*. 282:34700–34706.
77. Icekson, I., A.M. Kaye, M.E. Lieberman, S.A. Lamprecht, M. Lahav and H.R. Lindner. 1974. Stimulation by luteinizing hormone of ornithine decarboxylase in rat ovary: preferential response by follicular tissue. *Journal Endocrinology*. 63:417–418.
78. Igarashi, K and K. Kashiwagi. 2000. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 271: 559–564.
79. Jablonka-Shariff, A., and L.M. Olson. 1998. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology*. 139:2944-2954.

80. YoungLai, E.V. and A.G. Byskov. 1983. Relationship of meiotic prophase and ornithine decarboxylase in the neonatal rabbit ovary. *Cell and Tissue Research*. 231:565–570.
81. Kaipia, A., J. Toppari, P. Mali, M. Kangasniemi, A.A. Alcivar, N.B. Hecht and M. Parvinen. 1990. Stage- and cell-specific expression of the ornithine decarboxylase gene during rat and mouse spermatogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 73:45–52.
82. Katska-Ksiazkiewicz, L. 2006. Pig embryo production by *in vitro* maturation and fertilization of ovarian oocytes. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 15:525-542.
83. Know, H., T.E. Spencer, F.W. Bazer, and G. Wu. 2003. Developmental changes of amino acids in ovine fetal fluids. *Biology of Reproduction*. 63:1813-1820.
84. Knowles, R.G., and S. Mocada. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Journal Biochemical*. 298:249-258.
85. Koo, D.B., N.H. Kim, H.T. Lee and K.S. Chung. 1997. Effects of fetal calf serum, amino acids, vitamins and insulin on blastocoel formation and hatching of *in vivo* and IVM/IVF-derived porcine embryos developing *in vitro*. *Theriogenology*. 48: 791-802.
86. Kopf, GS. 1999. Acrosome reaction. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA. Vol 1: 17-26.
87. Krisher, R.L. and B.D. Bavister. 1998. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*. 59:103–14.
88. Krisher, R.L. 2013. *In vivo* and *in vitro* environmental effects on mammalian oocyte quality. *Annual Review of Animal Biosciences*. 1, 393-417.
89. Kubelka, M., J. Motlík, R.M. Schultz and A. Pavlok. 2000. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. *Biology of Reproduction*. 62:292–302.
90. Kuo, R.C., G.T. Baxter, S.H. Thompson, S.A. Stricker, C. Patton, J. Bonaventura, and D. Epel. 2000. NO is necessary a sufficient for egg activation at fertilization. *Nature*. 406:633-636.

91. Lander, H.M., A.T. Jacovina, R.J. David, and J.M Tauras. 1996. Differential activation of mitogen-activated protein kinase by nitric oxide-related species. *Journal of Biological Chemistry*. 271:705-709.
92. Lefèvre, P.L.C., M. Palin and B.D. Murphy. 2011. Polyamines on the Reproductive Landscape. *Endocrine Reviews*. 32(5): 694-712.
93. Levillain, O., A. Hus-Citharel, F. Morel and L. Bankir. 1990. Localization of arginine synthesis along rat nephron. *American Journal of Physiology*. 259: 916-923.
94. Li, J., J. Kim, P. Liston, T. Miyakaki, A.E. Mackenzie, R.G. Korneluk, and B.K. Tsang. 1998. Expression of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) in rat granulosa cells during ovarian follicular development and atresia. *Endocrinology*. 139:1321-1328.
95. Li, R., K. Whitworth, L. Lai, D. Wax, L. Spate, C.N. Murphy, A. Rieke, C. Isom, Y. Hao, Z. Zhong, M. Katayama, H. Schtten and R. Prather. 2007. Concentration and composition of free amino acids and osmolalities of porcine oviductal and uterine fluid and their effects on development of porcine IVF embryos. *Molecular of Reproduction and Development*. 74: 1228-1235.
96. López, G.C, C.A.J. López, A. Cremades, M.T. Castells and I.R. Peñafiel. 2009. Transcriptomic analysis of polyamine- related genes and polyamine levels in placenta, yolk sac and fetus during the second half of mouse pregnancy. *Placenta*. 30:241–249.
97. Lucas, X., E.A. Martínez, J. Roca, J.M. Vázquez, M.A. Gil, L.M. Pastor and J.L. Alabart. 2003. Influence of follicle size on the penetrability of immature pig oocytes for homologous *in vitro* penetration assay. *Theriogenology*. 60: 659–667.
98. Machado-Oliveira, G., L. Lefièvre, C. Ford, M.B. Herrero, C. Barratt, T.J. Connolly, K. Nash, A. Morales-Garcia, J. Kirkman-Brown and S. Publicover. 2008. Mobilisation of Ca²⁺ stores and flagellar regulation in human sperm by S-nitrosylation: a role for NO synthesised in the female reproductive tract. *Development*. 135: 3677-3686.
99. Manser, R.C., H.J. Leese and F.D. Houghton. 2004. Effect of inhibiting nitric oxide production on mouse preimplantation embryo development and metabolism. *Biology of Reproduction*. 71:528-533.
100. Marteil, G., L.Parpaillon and J. Z. Kubiak. 2009. Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. *Reproductive Biology*. 9: 203-224.

101. Martínez, M.B. 2002. Estudio de fecundación *in vitro* en porcino: Reducción de la poliespermia y optimización de la producción *in vitro* de embriones. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid, España.
102. Martínez, O.A. and M.F. Sánchez. 2004. Aeginine, nitric oxide and endothelial fuction. Pharmacy Abstracts. 45(4): 303-317.
103. Matás, C., M. Marco, P. Coy, R. Gadea, R. Romar and E. Garcia. 2002. The effect of different treatments of sperm on porcine *in vitro* fertilization. Theriogenology. 57: 676.
104. Mateo, R.D., G. Wu, F.W. Bazer, J.C. Park, I. Shinzato and S.W. Kim. 2007. Dietary L-arginine supplementation enhances the reproductive performance of gilts. The Journal of Nutrition. 137:652–656.
105. Maudsley, D.V. and Y. Kobayashi. 1974. Induction of ornithine decarboxylase in rat ovary after administration of luteinizing hormoneorhumanchorionic gonadotrophin. Biochemical Pharmacology. 23:2697–2703.
106. Melendrez, C.S., J.L. Ruttle, D.M. Hallford, P.S. Chaudhry and E.R. Casillas. 1992. Polyamines in ejaculated ram spermatozoa and their relationship with sperm motility. Journal of Andrology 13:293–296.
107. Meyen, B.A., C.F.Jr. Rosenkrans and D.L. Davis. 1989. Development of pig blastocysts *in vitro* is altered by serum, bovine serum albumin and aminoacids and vitamins. Theriogenology. 31: 463-471.
108. Mitchell, L.M., C.R. Kennedy, and G.M. Hartsshorne. 2004. Expression of nitric oxide synthase and effect of substrate manipulation of the nitric oxide pathway in mouse ovarian follicles. Human Reproduction. 19:30-40.
109. Morales, M.E., G. Rico, C. Bravo, R. Tapia, C.Alvarez and J.D. Méndez. 2003. Progressive motility increase caused by L-arginine and polyamines in sperm from patients with idiopathic and diabetic asthenozoospermia. Ginecología y Obstetricia de México 71:297–303.
110. Morris, S.M.Jr. 2006. Arginine: beyond protein. The American Journal of Clinical Nutrition. 83: 508-512.
111. Motta, A. B., and M.G. Fernández. 2001. Nitric oxide system and prostaglandin production in the mechanism of corpus luteum regression. Reproductive technologies. 10:22-28.

112. Muzikova, E. and D.A. Clark. 1995. Polyamines may increase the percentage of *in vitro* fertilized murine oocytes that develop into blastocysts. *Human Reproduction*. 10:1172–1177.
113. Nagai, T. y R.M. Moor. 1990. Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*; 26: 377-382.
114. Nagai, T. 2001. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*. 55:1291-1301.
115. Naito, K., Y. Fukuda and Y. Toyoda. 1998. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured *in vitro*. *Gamete Research*. 21: 289-295.
116. Nakamura, Y., Y. Namagata, N. Sugino, H. Takayama, and H. Kato. 2002. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. *Biology of Reproduction*. 67:1588-1592.
117. Ohashi, S., K. Naito, K. Sugiura, N. Iwamori, S. Goto, H. Naruoka and H. Tojo. 2003. Analyses of mitogen-activated protein kinase function in the maturation of porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. 68:604–609.
118. Palacin, M., R. Estevez, J. Bertran and A. Zorzano. 1998. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiological Reviews*. 78:969–1054.
119. Papaioannou, V.E. and Ebert, K.M. 1988. The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Development*. 102: 793-803.
120. Pegg, E.A. 2009. Mammalian polyamine metabolism and fuction. *IUBM Life*. 61(9): 880-894.
121. Pemble, L.B. and P.L. Kaye. 1986. Whole protein uptake by mouse blastocysts. *Journal of Reproduction and Fertility*. 78: 149-157.
122. Persson, L., k. Isaksson, E. Rosengren, F. Sundler. 1986. Distribution of ornithine decarboxylase in ovaries of rat and hamster during pro-oestrus. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)* 113:403–409.
123. Petters, R.M. and K.D. Wells. 1993. Culture of pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*. 48: 61- 73.

124. Polge, C. 1978. Fertilization in the pig and horse. *Journal of Reproduction and Fertility*. 54: 461-470.
125. Primakoff, P. DiG. Myles. 2002. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science*. 296(5576): 2183-2185.
126. Pulkkinen, P., R. Sinervirta and J. Jänne. 1975. Modification of the metabolism of rat epididymal spermatozoa by spermine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 67:714–722.
127. Rabier, D. and P. Kamoun. 1995. Metabolism of citrulline in man. *Amino Acids*. 9:299 –316.
128. Rathi, R., Colenbrander, B., Bevers, M.M., Gadella, B.M., 2001. Evaluation of *in vitro* capacitation of stallion spermatozoa. *Biology Reproduction*. 65:462–470.
129. Ratnasooriya, W.D. and M.G. Dharmasiri. 2001. L-arginine, the substrate of nitric oxide synthase, inhibits fertility of male rats. *Asian Journal of Andrology*. 3:97-103.
130. Reynolds, L.P and D.A. Redmer. 2001. Angiogenesis in the placenta. *Biology of Reproduction*. 64:1033–1040.
131. Robl, J.M. and D.L. Davis. 1981. Effects of serum on swine morulae and blastocysts *in vitro*. *Journal of Animal Science*. 52: 1450-1456.
132. Rose-Hellekant, T.A., E.A. Libersky-Williamson and B.D. Bavister. 1998. Energy substrates and amino acids provided during *in vitro* maturation of bovine oocytes alter acquisition of developmental competence. *Zygote*. 6:285–294.
133. Rosselli, M., P.J. Keller, and R.K. Dubey. 1998. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human reproduction*. 4:3-24.
134. Rozinek, J., J. Petr, R. Grocholova and F. Jilek. 1995. Microtubule rearrangement during *in vitro* maturation of pig oocytes—effect of cycloheximide. *Reproduction Nutrition Development*. 35:685–694.
135. Rubinstein, S., Y. Lax, Y. Shalev and H. Breitbart. 1995. Dual effect of spermine on acrosomal exocytosis in capacitated bovine spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1266:196– 200.
136. Sánchez, A.E. y M.E. Silva. 2003. Evaluación de la respuesta ovárica y calidad de ovocitos en gatas tratadas con hormona foliculo estimulante (FSH) utilizando dos esquemas de administración. *Archivos Médicos Veterinarios*. 35 (1): 119-126.

137. Sarkar, T., A.S. Petrov, J.R. Vitko, C.T. Santai, S.C. Harvey, I. Mukerji and N.V. Hud. 2009. Integration host factor (IHF) dictates the structure of polyamine-DNA condensates: implications for the role of IHF in the compaction of bacterial chromatin. *Biochemistry*. 48: 667–675.
138. Sengoku, K., K. Tamate, T. Yoshida, Y. Takaoka, T. Miyamoto and M. Ishikawa. 1998. Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*. 69:522–527.
139. Sengoku, K., N. Takuma, M. Horikawa, K. Tsuchiya, H. Komori, D. Sharifa, K. Tamate and M. Ishikawa. 2001. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*. 58: 262-268.
140. Schoevers, E.J., M.M. Bevers, B.A. Roelen, and B. Colenbrander. 2005. Nuclear and cytoplasmic maturation of sow oocytes are not synchronized by specific meiotic inhibition with roscovitine during *in vitro* maturation. *Theriogenology*. 63:1111-1130.
141. Seiler, N. and F. Raul. 2005. Polyamines and apoptosis. *Journal of Cellular Molecular Medicine*. 9:623–642.
142. Sirard, M.A., 2001. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*. 55:1241–1254.
143. Sooranna, S.R., N.H. Morris and P.J. Steer. 1995. Placental nitric oxide metabolism. *Reproduction, Fertility and Development*. 7: 1525-1531
144. Stojkovic, M., S.A. Machado, P. Stojkovic, V. Zakhartchenko, P. Hutzler, P.B. Goncalves and E. Wolf. 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biology of Reproduction*. 64:904–909.
145. Stroband, H.W.J. and T. Van der Lende. 1990. Embryonic and uterine development during early pregnancy in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*. 40: 261-277.
146. Sun, Q.Y., H. Breitbart and H. Schatten. 1999. Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. *Reproduction, Fertility and Development*. 11:443–450.
147. Sun, Q.Y., G.M. Wu, L. Lai, K.W. Park, R. Cabot, HT. Cheong, B.N. Day, R.S. Prather, and H. Schatten. 2001. Translocation of active mitochondria during pig oocyte

- maturation, fertilization and early embryo development *in vitro*. Journal of Reproduction and Fertility. 122:155-163.
148. Sun, Q.Y., and T. Nagai. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. Journal of Reproduction and Development. 49:347-359.
 149. Suzuki, F. and R. Yanagimachi. 1989. Changes in the distribution of intramembranous particles and filipin-reactive membrane sterols during *in vitro* capacitation of golden hamster spermatozoa. Gamete Research. 23(3): 335-347.
 150. Tabor, C.W. and H. Tabor. 1984 Methionine adenosyltransferase (S-adenosylmethionine synthetase) and S-adenosylmethionine decarboxylase. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology. 56:251–282.
 151. Tamanini, G., G. Basini, F. Grasselli, and M. Tirelli. 2003. Nitric oxide and the ovary. Journal of Animal Science. 81:E1-E7.
 152. Tao, Y., H. Xie, H. Hong, X. Chen, J. Jang, and G. Xia. 2005. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on porcine oocyte meiotic maturation. Zygote. 13:1-9.
 153. Thibault, C., D. Szöllözi and M. Gérard. 1987. Mammalian oocyte maturation. Reproduction Nutrition Development. 27:865–96.
 154. Tomek, W., H. Torner and W. Kanitz. 2002. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes *in vitro*. Reproduction in Domestic Animals. 37:86–91.
 155. Töpfer-Petersen, E., A.M. Petrounkina, and M. Ekhlesi-Hundrieser. 2000. Oocyte-sperm interactions. Animal Reproduction Science. 60-61: 653-662.
 156. Tosti, E., R. Boni and A. Cuomo. 2000. Ca²⁺ current activity decreases during meiotic progression in bovine oocytes. American Journal of Physiology Cell Physiology. 279:1795–1800.
 157. Tranguch, S., N. Steuerwld and Y.M. Huet-Hudson. 2003. Nitric oxide Synthase production and nitric oxide regulation of preimplantation embryo development. Biology of Reproduction. 68: 1538-1544.
 158. Van Blerkom, J. and M.N. Runner. 1984. Mitochondrial reorganization during resumption of arrested meiosis in the mouse oocyte. American Journal of Anatomy. 171:335–355.

159. Van Blerkom, J. 1991. Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 88:5031–5035.
160. Wallace, H.M., A.V. Fraser and A. Hughes. 2003. A perspective of polyamine metabolism. *Biochemical Journal.* 376:1–14.
161. Weiner, K.X. and J.A. Dias. 1993. Regulation of ovarian ornithine decarboxylase activity and its mRNA by gonadotropins in the immature rat. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 92:195–199.
162. Wessel, G.M., J.M. Brooks, E. Green, S. Haley, E. Voronina and J. Wong. 2001. The biology of cortical granules. *International Review of Cytology.* 209:117–206.
163. Wheeler, M.B., S. Clark and D. Beebe. 2004. Developments in in vitro technologies for swine embryo production. *Reproduction, Fertility and Development.* 16, 15–25.
164. Whittingham, DG. 1980. Parthenogenesis in mammals. In: *Oxford Reviews of reproductive*
165. *Biology.* Ed: Finn, CA. Clarendon Press, Oxford, UK. 2: 205-231.
166. Witte, T.S. and Schäfer-Somi. 2007. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Animal Reproduction Science.* 102: 181-193.
167. Wu, G., F.W. Bazer, W. Tuo and S.P. Flynn. 1996. Unusual abundance of arginine and ornithine in porcine allantoic fluid. *Biology of Reproduction.* 54:1261–5.
168. Wu, G. 1997. Synthesis of citrulline and arginine from proline in enterocytes of postnatal pigs. *American Journal of Physiology.* 272:1382-1390.
169. Wu G., K.P. Davis, N.E. Flynn, D.A. Knabe and J.T. Davidson. 1997. Endogenous synthesis of arginine plays an important role in maintaining arginine homeostasis in postweaning growing pigs. *The Journal of Nutrition.* 127 (12): 2341:2349.
170. Wu, G., S.M.Jr. Morris. 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal.* 336:1–17.
171. Wu, G., T.L Ott, D.A. Knabe and F.W. Bazer. 1999. Amino acid composition of the fetal pig. *The Journal of Nutrition.* 129:1031–1038.
172. Wu, G. and C.J. Meininger. 2000. Arginine nutrition and cardiovascular function. *The Journal of Nutrition.* 130: 2626–2629.

173. Wu G. and S.M. Jr. Morris. 2004. Arginine metabolism in mammals. In: Cynober LA, ed. Metabolic and therapeutic aspects of amino acids in clinical nutrition. Boca Raton, FL: CRC Press. 153– 67.
174. Wu, G., F.W. Bazer, S. Datta, G.A. Johnson, P. Li, M.C. Satterfield, and T.E. Spencer. 2008. Proline metabolism in the conceptus: Implications for fetal growth and development. *Amino Acids*. 35: 691-702.
175. Wu, G., F.W. Bazer, T.A. Cudd, C.J. Meininger and T.E. Spencer. 2004. Maternal nutrition and fetal development. *The Journal of Nutrition*. 134: 2169–2172.
176. Xiao, X.M. and L.P. Li. 2005. L-Arginina treatment for asymmetric fetal growth restriction. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 88: 15-18.
177. Yamauchi, N., H. Sasada, S. Sugawara and T. Nagai. 1996. Effect of culture conditions on artificial activation of porcine oocytes matured *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*. 8: 1153-1156.
178. Yanagimachi, R., 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *Physiology of Reproduction*, second ed. Raven Press, Ltd., New York, pp. 189–317.
179. Yao, Y., P. Ho and W.S. Yeung. 2000. Effects of human follicular fluid on the capacitation and motility of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*. 73: 680–686.
180. Yoshida, M., Y. Ishigaki, T. Nagai, M. Chikyu and V.G. Pursel, VG. 1993. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biology of Reproduction*. 49: 89-94.
181. Yoshida, M., Y. Ishigaki, H. Kawagishi, K. Bamba and Y. Kojima. 1992. Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes *in vitro* on subsequent fertilizing and developmental capacity *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 95: 481-488
182. Yoshioka, K., C. Suzuki and A. Onishi. 2008. Defined system for in vitro production of porcine embryos using a single basic medium. *Journal of Reproduction and Development*. 54: 208–213.
183. Yuan, Y. and R.L. Krisher. 2010. Effect of ammonium during in vitro maturation on oocyte nuclear maturation and subsequent embryonic development in pigs. *Animal of Reproduction Science*. 117, 302–307.
184. Zanelli, C.F. and S.R. Valentini. 2007. Is there a role for eIF5A in translation? *Amino Acids*. 33:351–358.

185. Zeng, X., F. Wang, X. Fan, W. Yang, B. Zhou, P. Li, Y. Yin, G. Wu and J. Wang. 2008. Dietary Arginine supplementation during early pregnancy enhances embryonic survival in rats. *The Journal of Nutrition*. 138: 1421-1425.
186. Zhao, Y.C., Y.J. Chi, Y.S. Yu, J.L. Liu, R.W. Su, X.H. Ma, C.H. Shan and Z.M. Yang. 2008. Polyamines are essential in embryo implantation: expression and function of polyamide related genes in mouse uterus during periimplantation period. *Endocrinology*. 149: 2325-2332.
187. Zheng, Y.S. and M.A. Sirard. 1992. The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes. *Theriogenology*. 37: 779-790.
188. Zhou, Y., C. Ma, J. Karmouch, H.A. Katbi and X.J. Liu. 2009. Antiapoptotic role for ornithine decarboxylase during oocyte maturation. *Molecular and Cellular Biology*. 29:1786–1795.
189. Zini, A., E. De Lamirande and C. Gagnon. 1995. Low levels of nitric oxide promote sperm capacitation *in vitro*. *Journal of Andrology*. 16:424–431.

ANEXO No. 1 Congelación de semen.

1. El eyaculado se obtuvo de la empresa comercial GENA Agrpecuaria.
2. Una vez obtenido el eyaculado por medio del método de mano enguantada, se diluyo 1:1 con citrato de sodio al 2.9% equilibrado a 37 °C y se transporto al laboratorio.
3. Una vez en el laboratorio, el eyaculado fue centrifugado en tubos Falcon de 50 ml durante 5 minutos a 1000 rpm.
4. Se retiró el sobrenadante.
5. Del pellet formado se observa la concentración espermática con cámara de Neubauer.
6. Se hacen los cálculos necesarios de diluyente (Cuadro 8) y el glicerol, para que al agregarse se obtenga una concentración final de 700×10^6 espermatozoides/ml.
7. Al tubo con el pellet se agrega el diluyente requerido sin glicerol y el semen es refrigerado a 16 °C durante 2 horas.
8. Pasadas las 2 horas se agrega el 6 % de glicerol y se refrigera a 4 °C durante una hora y media.
9. Envasar en pajillas de 0.5 ml.
10. Colocar en vapores de nitrógeno por 20 minutos.
11. Sumergir en nitrógeno líquido.
12. Almacenar.

Cuadro 8. Composición del diluyente para congelación de semen de cerdo

Diluyente	Cantidad para 100 ml
TRIS	3.02 g
Ácido cítrico monohidratado (CAM)	1.72 g
Fructuosa	0.9 g
Yema de huevo	20%
Glicerol	6%
Gentamicina	200 µg/ml