



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA.
FACULTAD DE VETERINARIA

**ANÁLISIS DE DIFERENTES FACTORES
QUE AFECTAN AL RENDIMIENTO DE LA
INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE
ESPERMATOZOIDES (ICSI) EN LA
ESPECIE PORCINA**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Empar García Roselló

Murcia, Mayo 2005



UNIVERSIDAD
DE MURCIA
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Fisiología
Fisiología Veterinaria

PILAR COY FUSTER y **CARMEN MATÁS PARRA**, Profesoras Titulares del Departamento de Fisiología (Fisiología Veterinaria), de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia,

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título "ANÁLISIS DE DIFERENTES FACTORES QUE AFECTAN AL RENDIMIENTO DE LA INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI) EN LA ESPECIE PORCINA" de la que es autora la Loda. en Veterinaria **Dña. Empar García Roselló**, ha sido realizada bajo nuestra dirección y cumple todas las condiciones necesarias para su lectura.

Murcia a 7 de Marzo de 2005

Fdo.: Pilar Coy Fuster

Fdo.: Carmen Matás Parra

Este trabajo ha sido financiado por la Fundación Séneca a través de una Beca de Formación de Personal Investigador (Programa Seneca 2000).

Financiado parcialmente por los proyectos AGL-2000-0485-C02-01 y AGL-20003-03144.

Que se satisfaga tu pasión por la ciencia, pero ante todo que tu ciencia sea humana, que te enriquezca a ti mismo y a la humanidad.

Hume, 1758

Investigación sobre el entendimiento humano.

A papá, mamá, Mireia y Héctor

A mis abuelas

AGRADECIMIENTOS

Después de un largo y duro trabajo, siempre queda para el recuerdo un sinfín de situaciones, anécdotas y personas..., un cúmulo de circunstancias que llenan un período de tu vida..., de las cuales, uno extrae, no sabe si por el buen saber de nuestro subconsciente, numerosas cosas positivas, olvidando aquellas que no lo fueron tanto. De todas he aprendido, pero las que provocan dichas situaciones y anécdotas, las que son de verdad importantes y sin éstas no hubieran existido las primeras, son las personas... Por ello, quiero transmitir en las líneas que siguen, aquello que a mi corazón le gustaría escribir...

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas y entidades que han hecho posible la realización de la presente Tesis. En concreto, al Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de Murcia.

A mis directoras de Tesis, Pilar Coy Fuster y Carmen Matás Parra, sin cuyo apoyo, estímulo y orientación, hubiera sido imposible realizar esta Tesis con tanta calidad y claridad. Por haberme dado la oportunidad de investigar en el mundo de la Fecundación *in vitro*, y por la gran amistad que hemos mantenido durante este tiempo.

Papá y mamá, daros las gracias es poco en comparación con todo lo que vosotros me habéis aportado. Por vuestro apoyo incondicional...

A Mireia.... Cada una de las aventuras "académicas" compartidas tiene algo tuyo y algo mío. Una nueva etapa empieza para nosotras, sé que seguirás ahí, como siempre lo has hecho. Gracias por compartir esta "segunda tesis".

A Loli, por ser una gran amiga y compañera de Tesis, por tu ayuda incondicional en lo profesional, pero muy especialmente en lo personal; por esa amistad sincera y desinteresada, sin ti esto no hubiera sido lo mismo. Gracias de todo corazón.

A los profesores Joaquín Gadea y Salvador Ruiz por todos sus consejos prácticos y teóricos. Y por estos 4 años de bonita amistad.

A Rakel Romar por estar siempre a disposición, porque has sabido siempre escucharme y aconsejarme en todos los aspectos, por todos aquellos conocimientos científicos que me has ofrecido durante estos años. Y por todo lo demás... Moltes gràcies.

A los Juanes, por su amistad y gran ayuda en la elaboración de los medios de cultivo y por todos los viajes realizados al Pozo para la recogida del material.

A mis grandes amigos y compañeros "precarios" Fran, David, Manolo y Sebas, sin su trabajo esta Tesis no hubiera llegado a su fin. No puedo dejar de sonreír recordando todas las anécdotas que hemos compartido juntos en casa "manolo". Por su colaboración en la cirugía y realización de las experiencias, por hacer más agradable los momentos más duros y por hacer más divertidas las experiencias en el laboratorio. Gràcies.

A Fran por prestarme su máxima colaboración. Por los sábados empleados desinteresadamente y por su ayuda incondicional en la preparación de esta tesis.

A Charlie por su originalidad y la colaboración prestada en la preparación de la portada esta tesis.

A todas las personas del "Institute for Animal Science. Department of Biotechnology" de Mariensse por darme la oportunidad de ampliar mis conocimientos en el amplio campo de la Biotecnología de la Reproducción.

A la Fundación Séneca por la financiación económica prestada a través de la beca FPI concedida para la realización de la Tesis.

A Beth y a Margot por su gran ayuda en las traducciones de esta tesis. Thanks a lot.

A todos los amig@s de que de alguna manera me han dado ánimos durante estos años de Tesis. Évita, Simón, Lola, Beth, Lidia, Vicente, Xavi, Beatriz, Elena, Toche, Silvi, Dani, Vicky, Raúl, Olga, Esther, Julieta, Josele... Gracias a tod@s.

A Héctor, que siempre gana todas las batallas..

ÍNDICE/INDEX

RESUMEN

SUMMARY

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 MADURACIÓN DEL OVOCITO

1.1.1 MADURACIÓN <i>IN VIVO</i>	3
1.1.1.1 Foliculogénesis	3
1.1.1.2 Ovogénesis	7
1.1.1.2.1 Crecimiento del ovocito	7
1.1.1.2.2 Maduración del ovocito	9
1.1.1.3 Ovulación	20
1.1.1.4 Transporte del ovocito en el oviducto	20
1.1.2 MADURACIÓN <i>IN VITRO</i>	21
1.1.2.1 Duración y condiciones de cultivo	22
1.1.2.2 Medios de cultivo y suplementos	23
1.1.2.3 Problemática actual	25
1.1.2.4 Inhibidores meióticos	27

1.2 FECUNDACIÓN

1.2.1 FECUNDACIÓN <i>IN VIVO</i>	30
1.2.1.1 Capacitación espermática	30
1.2.1.2 Reconocimiento y fusión de gametos	31
1.2.1.3 Activación del ovocito	33
a) Mediadores celulares en la activación	33

b) Modelos de activación _____	36
1.2.1.4 Formación de pronúcleos y singamia _____	37
1.2.2 FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i> _____	39
1.2.2.1 INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES _____	40
1.2.2.1.1 Concepto y aplicaciones _____	40
1.2.2.1.2 Antecedentes históricos _____	42
1.2.2.1.3 Aspectos técnicos _____	43
1.2.2.1.4 Fallos en la activación del ovocito _____	46
1.2.2.1.5 Uso de agentes activadores _____	47
1.2.2.1.6 Producción de descendencia viva _____	48
1.3 DESARROLLO EMBRIONARIO	
1.3.1 DESARROLLO <i>IN VIVO</i> _____	49
1.3.1.1 Segmentación o división embrionaria _____	49
1.3.1.2 Formación del blastocisto _____	51
1.3.1.3 Eclosión del blastocisto _____	52
1.3.1.4 Reconocimiento maternal de la gestación _____	53
1.3.2 CULTIVO DE EMBRIONES <i>IN VITRO</i> _____	54
1.3.2.1 Problemática actual en la especie porcina _____	54
1.3.2.2 Condiciones de cultivo _____	55
1.3.2.3 Medios de cultivo y suplementos _____	56
1.3.2.4 Morfología y calidad embrionaria _____	59
1.3.2.5 Valoración de la capacidad de desarrollo embrionario _____	59
1.3.2.6 Transferencia de embriones _____	60
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO _____	65
3. MATERIAL Y MÉTODOS _____	71
3.1 MEDIOS DE LAVADO Y MANIPULACIÓN GAMETOS _____	71

3.1.1 Transporte y lavado de ovarios y ovocitos _____	71
3.1.2 Dilución y lavado espermatozoides _____	72
3.2 MEDIOS DE CULTIVO Y SUPLEMENTOS _____	72
3.3 MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> (MIV) DE OVOCITOS _____	76
3.4 VALORACIÓN DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE GLUTATIÓN _____	78
3.5 PROCESADO DE LOS ESPERMATOZOIDES _____	80
3.6 INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI) _____	81
3.7 CULTIVO DE EMBRIONES _____	84
3.8 VALORACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS RESULTADOS _____	84
3.8.1 Valoración del estadio nuclear _____	84
3.8.2 Valoración de la formación pronuclear _____	88
3.8.2 Valoración del desarrollo embrionario _____	82
3.9 TRANSFERENCIA DE EMBRIONES _____	93
3.9.1 Transporte de los cigotos _____	93
3.9.2 Anestesia _____	93
3.9.3 Apertura de la cavidad abdominal _____	94
3.9.4 Cierre de la cavidad abdominal _____	95
3.9.5 Diagnóstico de gestación _____	95
3.10 DISEÑO EXPERIMENTAL _____	98
3.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO _____	106
4. RESULTADOS _____	109
4.1 EFECTO DEL TIEMPO DE CULTIVO EN MEDIO TALP SOBRE LOS PARÁMETROS DE ICSI Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO <i>IN VITRO</i> _____	109
4.1.1 Efecto del tiempo de cultivo en medio TALP sobre los parámetros de ICSI _____	109
4.1.2 Efecto del tiempo de cultivo en medio TALP sobre el desarrollo embrionario _____	110
4.2 EFECTO DE LA ROSCOVITINA SOBRE LA MADURACIÓN <i>IN VITRO</i>, ICSI Y DESARROLLO EMBRIONARIO <i>IN VIVO</i> _____	110

4.2.1 Estado nuclear de los oocitos tras 22h de cultivo en roscovitina	110
4.2.2 Progresión nuclear de los oocitos madurados <i>in vitro</i> con premaduración en roscovitina	113
4.2.3 Efecto de la roscovitina sobre el contenido en glutatión de los oocitos	115
4.2.4 Efecto de la roscovitina sobre la fecundación por ICSI	117
4.2.5 Efecto de la roscovitina sobre el desarrollo embrionario <i>in vivo</i>	118
4.2.6 Efecto del tiempo de MIV sobre la ICSI de oocitos premadurados en roscovitina	118
4.2.7 Efecto de la premaduración con roscovitina en oocitos porcinos madurados <i>in vitro</i> durante 36h.	119
4.3 EFECTO DEL InsP_3 SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO <i>IN VITRO</i>	120
5. DISCUSIÓN	125
6. INVESTIGACIÓN FUTURA	143
7. CONCLUSIONES	147
8. ABREVIATURAS	151
9. BIBLIOGRAFÍA	155
ENGLISH SECTION	
3. MATERIAL AND METHODS	177
3.1 WASHING AND GAMETE MANIPULATION MEDIA	177
3.1.1 Transport and washing of ovaries and oocytes	
3.1.2 Sperm dilution and washing	
3.2 CULTURE MEDIA AND SUPPLEMENTS	178
3.3 <i>IN VITRO</i> MATURATION (IVM)	181
3.4 INTRACELLULAR GSH CONTENT	182
3.5 SPERM PROCESSING	185
3.6 INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION (ICSI)	185

3.7 EMBRYO CULTURE	186
3.8 ASSESMENT OF RESULTS	186
3.8.1 Assesment of nuclear status	
3.8.2 Assesment of pronuclear formation	
3.8.2 Assesment of embryo development	
3.9 EMBRYO TRANSFER	188
3.10 EXPERIMENTAL DESIGN	188
3.11 STATISTIC ANALYSIS	195
4. RESULTS	199
4.1 EFFECT OF CULTURE TIME IN TALP MEDIUM ON EMBRYO DEVELOPMENT AND ICSI	199
4.1.1 Effect of time culture in TALP medium on ICSI parameters	
4.1.2 Effect of time culture in TALP medium on embryo development	
4.2 EFFECT OF ROSCOVITINE ON <i>IN VITRO</i> OOCYTE MATURATION, ICSI AND <i>IN VIVO</i> EMBRYO DEVELOPMENT	201
4.2.1 Nuclear status of oocytes after 22h of culture in roscovitine	
4.2.2 Effect of roscovitine on nuclear progression of oocytes	
4.2.3 Effect of roscovitine on intracellular GSH content	
4.2.4 Effect of roscovitine on fertilization by ICSI	
4.2.5 Effect of roscovitine on <i>in vivo</i> embryo development	
4.2.6 Effect of IVM time on ICSI oocytes prematurated in roscovitine	
4.2.7 Effect of roscovitine and 36h of IVM on fertilization by ICSI	
4.3 EFFECT OF $InsP_3$ ON <i>IN VITRO</i> EMBRYO DEVELOPMENT	208
5. DISCUSSION	213
6. FURTHER RESEARCHES	229
7. CONCLUSIONS	233

RESUMEN

La inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en la especie porcina es una herramienta con gran potencial aplicativo en diversos campos, entre los que destacan la producción de animales transgénicos de interés en ganadería o biomedicina, y la recuperación de razas en peligro de extinción. Aunque en la actualidad existen referencias de obtención de descendencia viva mediante esta tecnología, el rendimiento es muy inferior al de otras especies, posiblemente debido al desconocimiento de las condiciones idóneas para el desarrollo de la misma, y la dificultad de los cigotos para alcanzar el estadio de blastocisto *in vitro*. El presente trabajo se llevó a cabo para determinar diferentes factores que podrían afectar al rendimiento posterior de la técnica, estudiando para ello el efecto de 1) la secuencia de cultivo de los cigotos recién inyectados; 2) modificaciones en el sistema de maduración *in vitro* (MIV) tradicional, mediante el empleo de un inhibidor meiótico como es la roscovitina y variaciones a nivel de las horas de MIV, y por último 3) la activación exógena del ovocito mediante la inyección de inositol trifosfato (InsP₃) con el espermatozoide. El objetivo global de este estudio fue el de incrementar el rendimiento final de la ICSI en la especie porcina.

Para conseguir los objetivos propuestos se utilizaron ovocitos porcinos madurados *in vitro*. Además, se puso a punto en nuestro laboratorio un sistema de maduración modificado mediante el uso de la roscovitina, como inhibidor meiótico, durante las primeras 22-28h, dependiendo de la experiencia realizada. Para la puesta a punto de este sistema de maduración se valoró la capacidad de inhibición y el grado de reversibilidad de la roscovitina, y al mismo tiempo se valoró el contenido intracelular de glutatión en estos ovocitos. Una vez establecido este sistema de maduración, se valoró la capacidad de formación pronuclear mediante la ICSI y posteriormente se valoraron diferentes horas de MIV (36, 40 y 44h).

Todas las experiencias de ICSI se realizaron con espermatozoides frescos procedentes de eyaculados y los ovocitos no fueron tratados artificialmente para inducir su activación, salvo en la tercera experiencia, donde se utilizó el InsP_3 . Las inyecciones se realizaron sin el uso clásico de la polivinilpirrolidona (PVP) en el medio de suspensión de los espermatozoides.

Los resultados del estudio indican en la primera experiencia que los ovocitos porcinos recién inyectados alcanzan mejores porcentajes de ovocitos en estadio de 2 células cuando se cultivan durante 6 ó 20 horas en un medio de fecundación *in vitro* (FIV), como es el caso del medio TALP, pero no se observó efecto significativo en el desarrollo embrionario posterior. En cuanto a la segunda experiencia, los resultados indican que el empleo de la roscovitina a $50\mu\text{M}$ durante un período de 22-28h presenta capacidad de inhibir la ruptura de la vesícula germinal (GVBD) y este efecto es totalmente reversible al cultivar los ovocitos en un medio libre de inhibidor. La cantidad de glutatión también se vio afectada en presencia de inhibidor, obteniendo unas mayores cantidades en los ovocitos cultivados con roscovitina durante 22 horas, aunque al final de la maduración este efecto no se observó. La capacidad de formación pronuclear no se vio afectada por el inhibidor pero sí que se observó una mayor rapidez en la formación de embriones (2 células) en el grupo de ovocitos premadurados. En relación al desarrollo *in vivo*, los cigotos inyectados fueron capaces de iniciar gestaciones independientemente del uso de la roscovitina durante su maduración. En relación a las horas de MIV, los resultados demuestran que períodos de MIV de 36h ofrecen mejores porcentajes de fecundación que períodos de 44h. Estos resultados son similares en ausencia de roscovitina.

Por último, el empleo del InsP_3 como activador exógeno del ovocito no presentó efectos significativos en el desarrollo embrionario hasta estadio de blastocisto.

En conclusión, los datos obtenidos en el presente trabajo demuestran que la ICSI en la especie porcina puede ofrecer porcentajes de activación y fecundación elevados. El cultivo de los cigotos en medio TALP antes de transferirlos al medio de cultivo de embriones es beneficioso. La roscovitina a la dosis y tiempo utilizada puede emplearse como herramienta para el mantenimiento de los ovocitos en estadio de vesícula germinal (GV) sin afectar a la fecundación y al desarrollo embrionario posterior. Un periodo de MIV de 36 horas incrementa el rendimiento de la ICSI evaluado a las 22 h post-inyección. El InsP_3 en las condiciones experimentales empleadas no aumenta el rendimiento de la ICSI.

SUMMARY

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in pigs is a tool with an important applicable potential in diverse fields. One of this is the production of transgenic animals which is of interest in livestock and biomedicine, and the conservation of endangered species. Even though there are some cases of living offspring through this technique, its output is still quite low comparing to other species, possibly due to unknown factors referring to ideal conditions for the development, and to the difficulty of the zygotes to reach the blastocyst stage *in vitro*. The goal of this study was to evaluate different factors affecting the ICSI performance. This was done by studying 1) the sequence of culture of the injected oocytes; 2) *In vitro* maturation (IVM) modifications, through meiotic inhibitors, such as roscovitine, and changes in IVM duration time, and finally 3) the exogenous oocyte activation through inositol triphosphate (InsP₃) injection together with the sperm. The main objective of this study was to increase the final performance of ICSI in pigs.

To get the proposed goal, *in vitro* matured oocytes were employed. Moreover, two step-IVM system was carried out in our laboratory, through the use of roscovitine as a meiotic inhibitor during the first 22-28h of maturation, depending on the experiment realized. To start with this system, meiotic inhibition and reversibility capacity were assessed and also intracellular oocyte glutathione (GSH) content. Then, pronuclear formation ability through ICSI and different IVM times (36, 40 and 44h) were evaluated. All the ICSI experiments were done with fresh ejaculated semen and the oocytes were not treated artificially to induce activation, only in the last experiment where InsP₃ was used. The injections were carried out without the classical use of polivinilpirrolidone (PVP) in the sperm preparation medium.

Results in the first experiment show that porcine ICSI zygotes get higher two cells rate in presence of the used *in vitro* fertilization medium (TALP), but further embryo development is not affected. In relation to second experiment, results show that the germinal vesicle breakdown (GVBD) was inhibited in presence of 50µM roscovitine during 22-28h, and this effect was completely reversible when the oocytes were cultured in a free-inhibitor medium. Also GSH content was affected by the roscovitine. GSH content was higher in prematurred oocytes than in not prematurred ones at 22 h, although this effect was not observed at the end of the maturation. Pronuclear formation ability was not affected by the prematuration, but a quicker embryo development was observed in roscovitine treated oocytes. Concerning the *in vivo* development, the injected zygotes, prematurred or not with roscovitine, were able to establish pregnancies. In relation to IVM times, results show that oocytes matured for 36h can achieve better fertilization rates than the oocytes matured during 44h. These results are similar without roscovitine treatment.

Finally, no effect on embryo development until blastocyst stage was observed with the use of the InsP₃, such as an exogenous activating factor.

In conclusion, data show that porcine ICSI can achieve high activation and fertilization rates. The culture in TALP medium before transferring the zygotes to embryo culture medium is beneficial. Taking into account the concentration and duration of roscovitine prematuration, it can be used as an important tool for maintaining the germinal vesicle (GV) stage oocytes without compromising fertilization and further embryo development. An IVM period of 36 h increases the ICSI yield assessed at 22 h post-injection. InsP₃ does not improve the ICSI yield under the employed experimental conditions.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 MADURACIÓN DEL OVOCITO

1.1.1 MADURACIÓN *IN VIVO*

1.1.1.1 Folículogénesis

1.1.1.2 Ovogénesis

1.1.1.3 Ovulación

1.1.1.4 Transporte y maduración del ovocito

1.1.2 MADURACIÓN *IN VITRO*

1.1.2.1 Duración y condiciones de cultivo

1.1.2.2 Medios de cultivo y suplementos

1.1.2.3 Problemática actual

1.1.2.4 Inhibidores meióticos

1.2 FECUNDACIÓN

1.2.1 FECUNDACIÓN *IN VIVO*

1.2.1.1 Capacitación espermática

1.2.1.2 Reconocimiento y fusión de gametos

1.2.1.3 Activación del ovocito

1.2.1.4 Formación de pronúcleos y singamia

1.2.2 FECUNDACIÓN *IN VITRO*

1.2.2.1 INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES

1.2.2.1.1 Concepto y aplicaciones

1.2.2.1.2 Antecedentes históricos

1.2.2.1.3 Aspectos técnicos

1.2.2.1.4 Fallos en la activación del ovocito

1.2.2.1.5 Uso de agentes activantes

1.2.2.1.6 Producción descendencia viva

1.3 DESARROLLO EMBRIONARIO

1.3.1 DESARROLLO *IN VIVO*

1.3.1.1 Segmentación o división embrionaria

1.3.1.2 Formación del blastocisto

1.3.1.3 Eclósión del blastocisto

1.3.1.4 Reconocimiento maternal de la gestación

1.3.2 CULTIVO EMBRIONES *IN VITRO*

1.3.2.1 Problemática actual en la especie porcina

1.3.2.2 Condiciones de cultivo

1.3.2.4 Medios de cultivo y suplementos

1.3.2.5 Morfología y calidad embrionaria

1.3.2.6 Valoración de la capacidad desarrollo embrionario

1.3.2.7 Transferencia de embriones

1

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 MADURACIÓN DEL OVOCITO

1.1.1 MADURACIÓN *IN VIVO*

Los ovocitos son células altamente especializadas, las únicas capaces, junto con los espermatozoides, de llevar a cabo procesos meióticos y las únicas dependientes de la introducción de ADN externo, proveniente del espermatozoide para poder llevar a cabo las siguientes fases de desarrollo en condiciones *in vivo*.

Es necesario conocer con exactitud los cambios que se producen en el ovocito desde su origen embrionario hasta su transformación en una célula altamente especializada, ovocito en estadio de metafase II (MII), capaz de ser fecundada, para poder comprender los mecanismos fisiológicos relacionados con el proceso de fecundación, tanto *in vivo* como *in vitro*.

1.1.1.1 Foliculogénesis

Los ovocitos de todas las hembras de mamíferos se forman durante el desarrollo fetal. Éstos se encuentran alojados en el interior de los folículos primordiales (de cientos a miles) y abastecerán las necesidades de toda la vida reproductiva del animal. El número aproximado de folículos primordiales en la especie porcina es aproximadamente de 200.000 por ovario al nacimiento (Moor *et al.*, 1990).

Los folículos primordiales representan la unidad fundamental de desarrollo del ovario de los mamíferos. A lo largo del ciclo estral ocurren etapas sucesivas de crecimiento y regresión de folículos antrales que conducen al desarrollo de los folículos preovulatorios, constituyendo lo que denominamos dinámica folicular (Lucy *et al.*, 1992). A partir del nacimiento, de la reserva de los folículos primordiales se deriva el desarrollo o reclutamiento secuencial de grupos de folículos.

Los folículos primordiales están compuestos por un ovocito en crecimiento, rodeado por un número específico de especie de células planas pre-granulosas (Picton, 2001) que ejercen un efecto inhibitor sobre la meiosis y el crecimiento del ovocito. En la cerda, estos folículos primordiales están concentrados en una capa delgada, relativamente avascular, del córtex ovárico por debajo de la túnica albugínea. A diferencia de los folículos primordiales, los folículos en estadio más avanzado de crecimiento se encuentran siempre en la frontera córtico-medular altamente vascularizada. Se desconoce la naturaleza del factor desencadenante que transforma a un pequeño grupo de folículos primordiales en folículos primarios con crecimiento activo (Moor *et al.*, 1990), aunque sí se sabe que esta regulación es aparentemente intraovárica e insensible a las gonadotropinas (Peters *et al.*, 1993). En el interior de los folículos primarios están presentes los ovocitos, rodeados por una capa unilaminar de células pre-granulosas de morfología cúbica. Estas células presentan gran actividad mitótica y darán lugar a las células de la granulosa formando un epitelio estratificado. Entre el ovocito y las células de la granulosa circundantes se originan espacios, donde se deposita una sustancia que representa el inicio de la zona pelúcida (ZP), una cubierta extracelular glicoproteica que rodea a los ovocitos de mamíferos. La adquisición de la ZP es una característica del folículo preantral primario. Cuando se alcanza esta etapa de folículo primario, las células pre-granulosas no ejercen ningún efecto inhibitor sobre el crecimiento del ovocito pero sí sobre la meiosis (Thibault *et al.*, 1987). En este estadio, comienzan las mitosis de éstas células y al mismo tiempo el ovocito aumenta de tamaño. De este modo, el folículo primario se transforma en folículo preantral multilaminar (folículo secundario) que implica la transformación de células pre-granulosas que forman un epitelio estratificado alrededor del ovocito, llamándose células de la granulosa. Por fuera de la lámina basal, que separa las células de la granulosa del estroma, se diferencia una teca incipiente. Cuando las células de la granulosa alcanzan un número elevado como respuesta a la FSH, se forman cavidades

en el espacio extracelular llenas de un fluido denominado fluido folicular. A medida que la cantidad de líquido folicular aumenta, las cavidades que ocupan también aumentan de tamaño para formar el antro. Más tarde, con la aparición de la cavidad antral, el foliculo se denomina foliculo antral (**foliculo terciario**). Tras esto, las células de la granulosa se diferencian en dos subpoblaciones: por una parte, las células de la granulosa que revisten la pared del foliculo y forman un epitelio estratificado en contacto con la lámina basal; y por otra, las células del *cumulus oophorus* que forman varias capas de células cilíndricas alrededor del ovocito (Canipari, 1994).

Durante la amplia etapa preantral de la foliculogénesis, el desarrollo del ovocito depende de su estrecha relación con las células de la granulosa. También durante esta fase de crecimiento se forma la zona pelúcida. La capa de células más cercana a la ZP se denomina *corona radiata*.

Mientras se produce el desarrollo folicular, se inicia una cooperación metabólica entre las células de la granulosa y el ovocito. Durante esta etapa de crecimiento se va a establecer una comunicación entre las células del *cumulus* y el ovocito, mediante unos procesos citoplasmáticos de las células de la *corona radiata* que cruzan la ZP y conectan con el oolema, conocidos como uniones tipo *gap* (Gilula *et al.*, 1978). Las células de la granulosa también se interconectan entre ellas mediante estas uniones tipo *gap* (Anderson y Albertini, 1976). Este entramado de uniones intercelulares posibilita el intercambio de moléculas con el ovocito, con finalidad nutritiva y reguladora, constituyendo el proceso denominado "cooperación metabólica" (Canipari, 1994). Esta cooperación es bidireccional, ya que los ovocitos secretan diferentes factores que regulan la expansión y la esteroidogénesis (Prochazka *et al.*, 1998) del *cumulus*. Las células somáticas proporcionan nucleósidos, aminoácidos y fosfolípidos, además de mantener un balance iónico y una estabilidad en el ARNm de los ovocitos (Hunter, 2000). Conforme avanza el crecimiento folicular, las células de la teca se diferencian de las células de la granulosa y del resto de tejido del estroma que los rodea. La capa interna asume eventualmente la apariencia de las típicas células secretoras de esteroides. Durante los estadios finales del crecimiento del foliculo preantral, y con más importancia del foliculo antral o preovulatorio, las células de la granulosa y de la teca se diferencian y progresivamente se hacen más sensibles a la estimulación por gonadotropinas. Así, la formación de receptores funcionales de gonadotropinas en estas células, en los estadios apropiados de desarrollo

folicular (Oktay *et al.*, 1997; McNatty *et al.*, 1999) junto con el desarrollo de la función esteroidea en ambos tipos celulares, (células de la granulosa y de la teca) pueden utilizarse como marcadores funcionales del desarrollo folicular normal tanto *in vivo* como *in vitro*.

La selección de folículos, que producirán ovocitos listos para ovular en cada ciclo estral, viene determinada por la expresión de receptores de la hormona luteinizante (LH), en las células de la teca, y la hormona folículo estimulante (FSH), en las células de la granulosa (Espey, 1999). Los folículos antrales más pequeños no poseen receptores de LH en las células de la granulosa, por lo tanto no se verá reanudada la meiosis durante el pico de gonadotropinas. La FSH actúa sobre las células de la granulosa desencadenando la expresión de una batería de genes que codifican diferentes factores de crecimiento, enzimas y proteínas involucradas en la esteroidogénesis y péptidos que regulan la liberación de gonadotropinas, los cuales se van a sintetizar y acumular en el fluido folicular (Stromstedt y Byskov, 1999). Al mismo tiempo, la LH estimula las células de la teca dando lugar a la producción de andrógenos que, posteriormente se transformarán en estradiol por las células de la granulosa (Stromstedt y Byskov, 1999). Estos estrógenos sintetizados estimulan la formación de receptores de LH en las células de la granulosa.

Es importante señalar que no todos los folículos primordiales en el ovario post-natal iniciarán su crecimiento al mismo tiempo. Existen diversos factores que estimulan el inicio del crecimiento como el factor de diferenciación 9 (Growth differentiation factor GDF-9), mientras otros factores retienen a estos folículos en un estadio de reposo (Eppig, 2001). El balance entre estos factores de crecimiento debe igualmente regular la susceptibilidad a la apoptosis de los folículos tempranos (Braw-Tal, 2002).

El tiempo que tardan los folículos primordiales en convertirse en folículos preantrales es relativamente largo y varía entre las diferentes especies (Picton, 2001). En la especie porcina, la duración aproximada desde el folículo primordial hasta estadios finales preovulatorios es aproximadamente de tres meses (Morbeck *et al.*, 1992). La formación del antro es un evento tardío, que puede llevar varios meses en rumiantes y primates (Gougeon, 1996).

Uno de los puntos más difíciles de dilucidar en la fisiología del ovario son los factores que determinan que los folículos permanezcan senescentes, que entren en desarrollo y en proceso de atresia (muerte folicular), mientras un tercer grupo madura y es ovulado.

Existen dos eventos importantes durante la foliculogénesis, el *reclutamiento inicial* y el *reclutamiento cíclico*. El primero se da de una forma continua y empieza en el preciso momento en que se han formado los folículos, mucho antes de la pubertad, y es el responsable de que los folículos primordiales salgan de su estado de reposo y comiencen una etapa de crecimiento. Durante el *reclutamiento inicial*, factores intraováricos u otros factores desconocidos, estimulan a un grupo de folículos primordiales a iniciar el crecimiento, mientras el resto permanece senescente durante meses o años. Este proceso podría deberse a la liberación de estímulos inhibitorios que hasta ese momento mantenían a los folículos en reposo (McGee y Hsueh, 2000). El *reclutamiento cíclico* comienza después de la llegada a la pubertad, como resultado de un aumento en los niveles de FSH circulante durante los ciclos reproductivos. Esto permite que una cohorte de folículos en fase antral sea rescatada del proceso de atresia. En este momento, los folículos han completado su crecimiento y los ovocitos adquirido la zona pelúcida y se encuentran competentes para reanudar la meiosis. De este modo, sólo un número de folículos sobrevivirá, mientras que el resto entrará en atresia.

1.1.1.2 Ovogénesis

1.1.1.2.1 Crecimiento del ovocito

Los ovocitos presentes en el ovario se originan a partir de un número de células germinales primordiales (CGP) que derivan del endodermo del embrión en desarrollo; posteriormente emigran hasta el mesenterio y se exteriorizan en las crestas genitales. Estas células son grandes y poseen un núcleo redondo con uno o varios nucleolos; además, en su citoplasma están presentes pequeñas mitocondrias, túbulos y cisternas del retículo endoplasmático, polirribosomas, complejos de Golgi, microfilamentos, y un número variable de partículas de glucógeno y gotas lipídicas (Picton, 2001). Las partículas de glucógeno y las gotas lipídicas almacenadas en estas CGP servirán de reserva energética durante la migración hasta las crestas genitales. Inicialmente, el transporte de estas CGP hacia el presunto ovario

depende de una transferencia pasiva que ocurre como consecuencia de los cambios que se están produciendo en el embrión en desarrollo. Posteriormente, este transporte es dependiente del movimiento morfogénico y de propulsión de estas células con alta motilidad como respuesta a determinadas sustancias quimiotácticas, como el factor de transformación del crecimiento (TGF β 1). Una vez establecidas en el ovario primordial, estas células pierden su motilidad y son transformadas en ovogonias, las cuales comienzan a dividirse por sucesivas mitosis, hasta que la última generación de ovogonias entra en meiosis dando lugar a los ovocitos primarios.

En las hembras, toda la población de ovocitos entra en meiosis sincrónicamente en la vida fetal. La primera división meiótica progresa hasta que el ovocito alcanza el estadio de diplotene difuso de la profase I (estado de dictiatio) caracterizado por la presencia de un núcleo prominente que recibe el nombre de vesícula germinal (GV). Los ovocitos en estadio de diplotene son más grandes que las ovogonias, y poseen mayor cantidad de organelas citoplasmáticas. Este ovocito se encuentra en el equivalente estadio mitótico G2 ya que el ADN se ha replicado antes de comenzar la meiosis. En esta etapa, la meiosis del ovocito se encuentra inhibida. La detención meiótica se mantiene por un sistema de múltiple control donde intervienen el AMPc (Schultz, 1991; Mattioli 1994) y otros factores (Thibault *et al.*, 1987). Este estadio no presenta cambios hasta que los folículos dominantes son estimulados por el pico de gonadotropinas. La mayoría de los ovocitos suele haber llegado a este estadio en la fase final de la vida fetal del individuo.

El inicio del crecimiento lleva asociado una expresión coordinada de genes específicos del ovocito, como ZPA, ZPB, ZPC, mediante los cuales tendrá lugar la formación de la ZP (Miller, 1999). Esta estructura proporciona una superficie protectora al ovocito impidiendo el paso de sustancias con peso molecular mayor de 170kDa. Los estudios realizados sobre el proceso de formación de la ZP no son del todo claros y generan bastante polémica. En referencia al trabajo realizado por Sinowatz *et al.*, en 2001 existen tres teorías; una primera que describe que el ovocito es el único participante en la síntesis de las glicoproteínas de la ZP, otra en la que las responsables de la síntesis son las células foliculares y la última en la que las células foliculares conjuntamente con el ovocito se encargan de su formación. La ZP está formada por tres clases de glicoproteínas

denominadas ZP1, ZP2 y ZP3, que en la especie porcina se conocen como ZP3 α , ZP1 y ZP3 β , respectivamente (Miller, 1999), y se combinan para formar una capa de alrededor de 15 μ m de grosor rodeando al ovocito (Cohen *et al.*, 1992). Aunque los tres componentes de la zona juegan un papel importante en el mantenimiento de la estructura de la ZP, están altamente diferenciados en relación a su papel biológico. La ZP1, en el caso del ratón, actúa como nexo de unión entre los filamentos de la ZP2 y la ZP3. Esta última, se ha demostrado que actúa como receptor primario de reconocimiento espermático en esta especie. La unión entre la cabeza espermática y la ZP3 da lugar a la inducción de la reacción acrosómica (Wassarman, 1988). Después de producirse la reacción acrosómica, la ZP2 actúa como receptor secundario de reconocimiento facilitando la penetración del espermatozoide reaccionado a través de la zona. No obstante, existen diferencias entre especies en cuanto al papel fisiológico de las distintas glicoproteínas, y quedan actualmente numerosos aspectos por investigar.

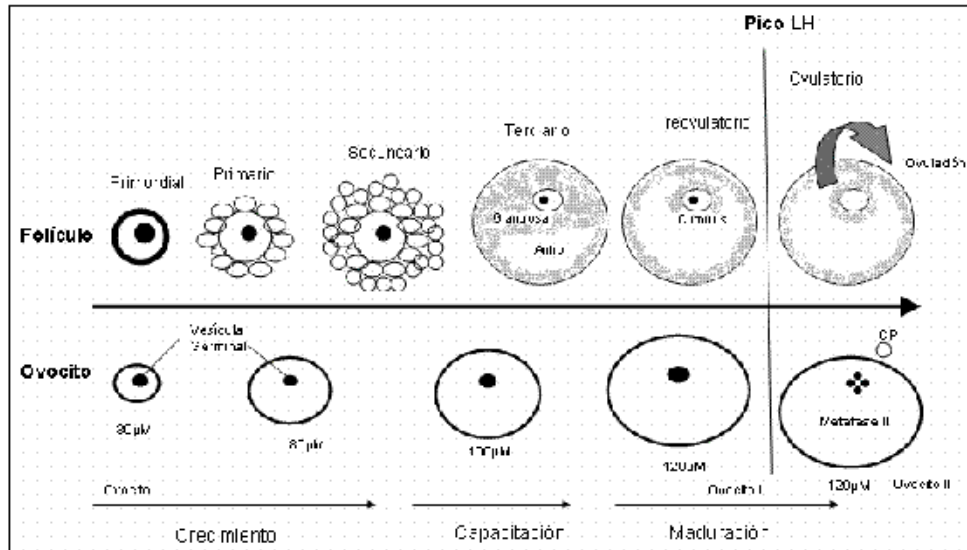
Los ovocitos bovinos y porcinos crecen desde un diámetro de 30 μ m (sin incluir ZP) en estadios tempranos de crecimiento hasta un diámetro aproximado de 120-125 μ m (Hytzel *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 1998).

1.1.1.2.2 Maduración del ovocito

Durante la maduración del ovocito, se producen una compleja serie de modificaciones en el citoplasma, junto con la maduración meiótica del núcleo y ciertos cambios en la membrana, con el fin de preparar a este ovocito para ser fecundado con éxito y poder mantener la primera fase de desarrollo embrionario.

En la figura 1 se representan las diferentes fases del crecimiento, capacitación y maduración durante la foliculogénesis del ovocito según Mermillod *et al.* (1999).

FIGURA 1. Representación esquemática del crecimiento del ovocito, capacitación y maduración durante la foliculogénesis (Mermillod *et al.*, 1999).



a) Maduración citoplasmática

Los cambios que acontecen en el paso de ovocito primordial hasta embrión transcricionalmente activo se pueden dividir en tres:

- Programa de crecimiento único o **capacitación ovocitaria**, que es el proceso de preparación del ovocito durante la foliculogénesis que posibilita un desarrollo embrionario posterior (Hytel *et al.*, 1997; Moor *et al.*, 1998). En este periodo sólo se dividen las células somáticas, no el ovocito. Representa un período de síntesis intensa y almacenamiento de macromoléculas. El ovocito durante esta etapa es incapaz de pasar del estadio del ciclo celular G2 a metafase. Las células foliculares proporcionan soporte metabólico e instruccional para que el ovocito no cambie de fase dentro del ciclo celular.

Los ovocitos que se encuentran dentro de los folículos primordiales son metabólicamente activos. Estos ovocitos responden a las señales de

crecimiento intraováricas y comienzan una fase de síntesis activa. Esta fase de crecimiento es única y difiere de las células somáticas en tres aspectos importantes. En primer lugar, a pesar de que el ovocito aumente su tamaño, este proceso tiene lugar en ausencia completa de división celular. Por otra parte, gran parte de los productos procedentes de la transcripción y traducción no se utilizan durante esta fase de crecimiento activo, pero se almacenan para posterior uso durante la embriogénesis temprana. Por último, la regulación del crecimiento y ciclo celular del ovocito está mediada por una serie de complejas interacciones con las células somáticas que rodean al ovocito. Durante el estadio de folículo primordial, las células que rodean al ovocito probablemente ejercen una influencia negativa en el crecimiento del ovocito. Este efecto negativo desaparece cuando estas células son estimuladas por mecanismos desconocidos y entran en mitosis (Thibault *et al.*, 1987). Por lo tanto, esta cooperación metabólica mediada por el soporte celular es importante para el crecimiento del ovocito.

- **Modificaciones bioquímicas y morfológicas** del ovocito durante la maduración que son desencadenadas por el **pico de LH**. La maduración ovocitaria está desencadenada por la respuesta folicular al pico preovulatorio de gonadotropinas, que confiere al ovocito la capacidad de sostener la fecundación y el desarrollo embrionario temprano. Durante esta fase de maduración, las células de la granulosa siguen produciendo esteroides, pero tiene lugar el paso de un ambiente estrogénico a otro donde predomina la progesterona. Por otra parte, producen ácido hialurónico que permite la expansión y mucificación de las células del *cumulus* y pérdida de las uniones tipo *gap* de contacto entre el ovocito y estas células. El potencial para la maduración nuclear y citoplasmática se adquiere conjuntamente durante el desarrollo del ovocito (Moor *et al.*, 1998; Picton *et al.*, 1998).

Las interacciones entre las células foliculares y el ovocito son cruciales para el inicio y finalización de esta fase de diferenciación o maduración. Cuando la asociación entre las células foliculares y el ovocito se pierde, aumenta el transporte de membrana y se produce una resituación de organelas citoplasmáticas. Algo del ARNm almacenado durante la fase de crecimiento empieza a transcribirse y las proteínas resultantes juegan un papel crítico en la progresión del ciclo meiótico, en la regulación de la penetración del espermatozoide y en su posterior descondensación.

Por otra parte, durante este estadio de diferenciación, las mitocondrias uniformemente distribuidas en el citoplasma de ovocitos en estadio de GV, se agregan alrededor del núcleo, momento que coincide con la rotura de la vesícula germinal (Thibault *et al.*, 1987). Este agrupamiento mitocondrial y posterior dispersión en estadio de anafase/telofase es microtúbulo dependiente y necesario para la progresión de la maduración.

Mientras que las mitocondrias migran para alcanzar una posición perinuclear durante el periodo de maduración, los gránulos corticales (GC) migran hacia la membrana celular formando una monocapa irregular (Cran y Cheng, 1986). A menudo se forma una zona desprovista de organelas cerca de esta monocapa de gránulos corticales, mientras que una delgada capa de filamentos de actina se interpone entre los GC y el coeloma.

Los GC representan una forma especial de lisosomas primarios esféricos, limitados por una membrana, con un tamaño variable y compuestos por glicoproteínas y enzimas hidrolíticas. Se originan a partir del aparato de Golgi y el retículo endoplásmico rugoso, y se forman durante el crecimiento folicular mediante un crecimiento continuo hasta que se produce la ovulación.

Ha sido demostrado que la migración de los GC es un evento necesario para el bloqueo a la polispermia. El desarrollo de la capa de filamentos de actina está probablemente relacionado con la estabilización de los GC, además de ser importantes para su exocitosis. Todavía no está del todo claro por qué una zona desprovista de organelas se forma cerca de esta capa de GC en los ovocitos porcinos. Los ribosomas aumentan en número y el aparato de Golgi se alarga y se transforma en cisternas dilatadas situadas en el córtex del ovocito donde será activo en la exportación de glicoproteínas a la ZP (Picton, 1998) y en la formación de GC necesarios en la fecundación. El retículo endoplasmático también adquiere posición cortical, donde llevará a cabo la liberación de calcio para que se produzca la exocitosis de los GC. También durante la maduración citoplasmática se produce un aumento en la acumulación de lípidos y glutatión (Rodríguez y Farin, 2004).

La remodelación citológica está acompañada de una maduración molecular con síntesis y almacenamiento de una amplia variedad de proteínas durante el crecimiento del ovocito. Se ha visto que esta

maduración molecular ocurre unas pocas horas antes de la recogida de ovocitos (en hembras sincronizadas hormonalmente) (Sirard *et al.*, 2003). Se sabe que el ARNm es la forma principal de almacenamiento de información en los ovocitos y éste permanece estable durante días (Brower *et al.*, 1981). Durante esta reprogramación, tiene lugar al mismo tiempo nueva síntesis y cese de síntesis de ciertas proteínas específicas del estadio de GV. Estas nuevas proteínas sintetizadas juegan un papel importante en la progresión del ciclo meiótico hasta su finalización, con la formación del pronúcleo femenino.

La clave en la maduración y viabilidad embrionaria reside en el compartimento folicular más que en el propio ovocito. Fallos en la adquisición de estas sustancias no permitirán al ovocito adquirir los nutrientes y señales necesarias para el desarrollo embrionario posterior.

- Como consecuencia de la reorganización y utilización de los productos formados durante las dos fases anteriores, el ovocito crece, finaliza el control materno del desarrollo y se **activa el genoma embrionario**. Durante esta fase se produce una nueva transcripción embrionaria (Sirard, 2001). En el ratón, se ha visto que el genoma embrionario toma el control del desarrollo temprano inmediatamente después de la fecundación, en el estadio de dos células, mientras que en grandes animales, esta transición ocurre unos ciclos celulares posteriores (Bachvarova, 1985). El ovocito contiene las instrucciones apropiadas para llevar a cabo las primeras divisiones. Esta transición se denomina transición maternal a cigoto (*maternal to zygotic transition*, MZT) y requiere la traducción de nuevas proteínas (Sirard, 2001).

La reorganización y utilización de los productos almacenados durante el crecimiento del ovocito constituye una pieza clave del programa de maduración. Estos eventos de diferenciación no son dependientes de la regulación nuclear; sin embargo, controlan la progresión del ciclo meiótico y otros eventos intracelulares que confieren al ovocito la competencia para el desarrollo posterior. Estos cambios tienen lugar en los diferentes componentes del ovocito y están facilitados o regulados por las células somáticas del folículo.

No existen métodos para diferenciar ovocitos competentes o incompetentes, excepto por cambios en la morfología del nucleolo asociados

al proceso de la capacitación ovocitaria (Hyttel *et al.*, 1997). Únicamente se puede valorar esta competencia mediante la tecnología de la fecundación *in vitro* y transferencia embrionaria (Sirard *et al.*, 2003).

b) Maduración Nuclear

La meiosis es un tipo de división celular característico de las células germinales (espermatogonias y ovogonias). Su objetivo es doble: la reducción de un número diploide de cromosomas a un número haploide y la recombinación de la información genética (Polanski y Kúbiak, 1999). Es importante el estudio detallado de estos procesos que tienen lugar en el interior del ovocito para posteriormente, comprender el mecanismo que tiene lugar durante la fecundación.

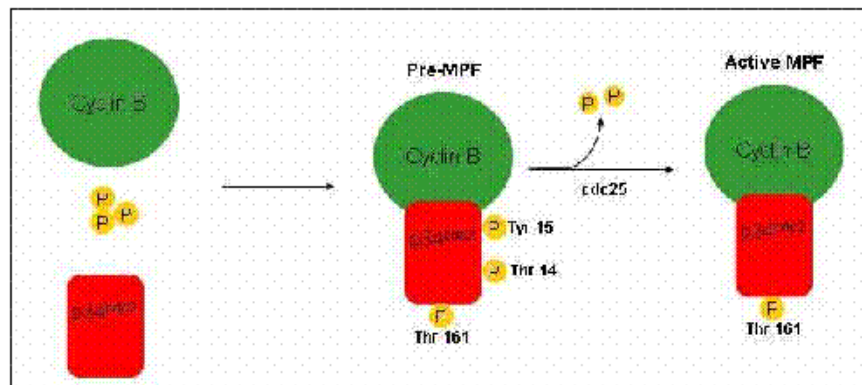
En la especie porcina, los folículos menores de 0.7mm de diámetro contienen ovocitos incapaces de reanudar la meiosis (Hunter, 2000). La capacidad de desarrollo se incrementa conforme va aumentando el diámetro del folículo (Hunter, 2000).

Los ovocitos de la mayoría de mamíferos se encuentran en estadio de diplotene de la profase I, hasta que se produce la adecuada estimulación de factores de crecimiento y hormonales dando lugar a la progresión de estos ovocitos al estadio de MII. Posteriormente, éstos quedarán en este estadio de MII hasta que se produzca la fecundación.

Los ovocitos porcinos necesitan de un periodo de síntesis proteica (al que nos hemos referido previamente durante la maduración citoplasmática), anterior a la rotura de la vesícula germinal (GVBD), para una progresión normal en el ciclo meiótico (Fulka *et al.*, 1986). La inhibición de la síntesis proteica en diferentes estadios posteriores a la inducción de la maduración en ovocitos porcinos demuestra que las proteínas necesarias para la progresión del ciclo celular son sintetizadas en suficiente cantidad para que tenga lugar la GVBD a las 12-16h después del pico de LH. Sin embargo, la nueva síntesis proteica no se requiere para la condensación cromatínica o desaparición del nucleolo, pero sí es absolutamente necesaria para la rotura de la membrana nuclear (Kubelka *et al.*, 1988).

⇒ Adquisición de la competencia meiótica; la adquisición de la capacidad meiótica está asociada con la aparición de componentes esenciales del ciclo celular como el factor promotor de la metafase (MPF, Masui y Market, 1971), una quinasa que se activa en ovocitos completamente desarrollados entre las 8 y 12h después de la inducción de la maduración. El MPF (figura 2) se constituye gracias al ensamblaje de una subunidad reguladora (Ciclina B) y una subunidad catalítica. Esta última es una proteína de 34-kDa denominada p34^{cdc2}, en la que se lleva a cabo la transferencia de grupos fosfatos del ATP a residuos específicos de serina y treonina, y otra. Esta quinasa es una de las quinasas principales en la regulación de la transición de la fase G2/M durante la mitosis, así como en la meiosis ovocitaria. Los ovocitos porcinos en crecimiento ($\leq 90 \mu\text{m}$ de diámetro) son incapaces de reanudar la meiosis *in vitro*. Esta incapacidad para reanudar la meiosis no viene dada por una deficiencia en el MPF y/o proteínquinasas activadoras de la mitosis (MAP quinasas), ya que la cantidad de las dos subunidades de MPF, p34^{cdc2} y la ciclina B en ovocitos en crecimiento es comparable a la existente en ovocitos totalmente desarrollados. Pero estos ovocitos contienen la forma fosforilada de la p34^{cdc2}, que no permite la activación del MPF hasta que no completen su crecimiento (Christmann *et al.*, 1994). Posteriormente, cuando los folículos alcanzan un diámetro de 1.0-1.5mm, los ovocitos que han reanudado la meiosis y se encuentran en estadio de MI, son capaces de activar la subunidad catalítica (cdc2), pero todavía no han establecido una vía MAP quinasa-activadora por lo que no son capaces de proseguir la maduración hasta estadio de MII (Motlik *et al.*, 1984). Por lo tanto, se sabe que la adquisición de la competencia meiótica en ovocitos porcinos se correlaciona con la capacidad para activar a estas dos proteínas, MPF y MAP-quinasas (Kanayama *et al.*, 2002). En primer lugar adquieren la capacidad de activar la subunidad cdc2 y posteriormente la adquieren para activar la vía MAP quinasa durante la fase de crecimiento.

FIGURA 2. Representación esquemática del MPF con sus dos subunidades.



⇒ *Reanudación de la meiosis*; en la especie porcina la capacidad para reanudar la meiosis se adquiere cuando los folículos alcanzan un diámetro de 3mm o más (Marchal *et al.*, 2002).

Se han estudiado diversas moléculas que regulan el proceso meiótico, y entre ellas se encuentran:

- **Adenosínmonofosfato cíclico (AMPC)**: La reanudación de la meiosis viene precedida por un aumento en el AMPC. Los niveles basales de AMPC producidos por las células somáticas en los folículos son transferidos de una manera continuada al ovocito a través de las uniones tipo *gap*; de esta manera, se mantiene el ovocito en el arresto meiótico. Posteriormente, a partir de la formación de receptores de la LH, las células de la granulosa y del *cumulus* responden al pico preovulatorio produciendo grandes cantidades de AMPC. Estas elevadas concentraciones de LH median en la acción de la **conexina 43**, proteína que forma parte de las uniones tipo *gap* de las células foliculares. Se producen cambios en la conformación de esta conexina, vía proteínquinasa C (PKC) y/o vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (**PI 3-Kinase**). La activación de esta última quinasa provoca en las células del *cumulus* la fosforilación de la conexina 43 produciéndose una reducción de las comunicaciones intercelulares en dichos folículos y por lo tanto en la cooperación metabólica (Gilula *et al.*, 1978). Este proceso es conocido como expansión o mucificación del *cumulus* (Eppig, 1979) y se produce a las 16h posteriores al pico preovulatorio de gonadotropinas. Por otra parte, la activación de esta PI 3-quinasa en las células del *cumulus*

contribuye a la activación de las MAP quinasas y MPF (Shimada y Terada, 2001). Bajo estas condiciones, el flujo de AMPc desciende por debajo del umbral requerido para inhibir la activación de MPF y el ovocito reanuda la meiosis (Dekel, 1999).

- **MPF**: El proceso de reanudación de la meiosis está controlado a través de la activación mediante una vía de señal transductora que incluye el MPF. Este factor se activa durante el comienzo de la maduración ovocitaria, al iniciarse la GVBD y aumenta en estadio de MI; posteriormente, su actividad decae en estadio de anafase/telofase I y vuelve a alcanzar un pico en estadio de MII (Wu *et al.*, 1997).

La activación de este factor viene inducida por la defosforilación de la tirosina de la subunidad catalítica p34^{cdc2} y síntesis de la ciclina B. En ovocitos porcinos completamente desarrollados, está presente el complejo asociado de ambas subunidades (Chen *et al.*, 2000), pero el aumento de la forma activa del MPF hasta concentraciones efectivas requiere síntesis proteica activa (Motlik y Kubelka, 1990).

- Junto con el MPF participan otras quinasas reguladoras de la señal extracelular (**ERK**) que intervienen en la maduración del ovocito en diferentes especies (Inoue *et al.*, 1995). Se ha descrito la expresión de dos isoformas no fosforiladas de ERK en ovocitos mamíferos inmaduros; ERK1 (44kDa) y ERK2 (42kDa). Ambas se vuelven activas mediante su fosforilación durante el período de la rotura de la vesícula germinal (GVBD). Estas dos isoformas pertenecen a la superfamilia de las proteínquinas activadoras de la mitosis **MAP quinasas**, entre las cuales también destacan la MAPK p38 y la c-Jun N- terminal quinasas (**JNK**, también conocidas como proteínquinas por estrés). Todas ellas son proteínquinas serina-treonina. Recientemente se ha estudiado la MAPK p38 en ovocitos porcinos demostrándose que esta proteína se activa durante la GVBD, permaneciendo en este estado activo durante la progresión de MI a MII. También se ha descubierto la presencia de esta proteína en las células del *cumulus* participando en la expansión de éste inducida por la FSH. La inhibición de esta proteína bloquea la reanudación de la meiosis inducida por FSH en ovocitos con *cumulus* y bloquea la transición de MI-MII en ovocitos desnudos (Villa-Díaz y Miyano, 2004).

- **PKC** (proteínquinasa C): Diferentes estudios muestran la existencia de diversas isoformas de las PKC que se concentran en el estadio de GVBD de ovocitos porcinos (Fan *et al.*, 2003). Shimada y Terada en 2001 observaron que la reanudación de la meiosis de los ovocitos porcinos estaba asociada con la vía de la PKC en las células del *cumulus*.

La maduración meiótica del ovocito conlleva la capacidad para la rotura de la membrana nuclear, y posterior progresión del ovocito de la fase G2 del ciclo celular de estadio de diplotene de la profase de la primera división meiótica hasta MII.

Resumiendo, la reanudación de la meiosis puede explicarse mediante una reducción en la concentración de AMPc y la consiguiente activación-inactivación de proteínas presentes en el ooplasma (Fulka *et al.*, 1998; Moor *et al.*, 1998; Picton *et al.*, 1998).

Se ha demostrado mediante detallados análisis citológicos de los eventos meióticos que tienen lugar durante la maduración, que los cambios en la cromatina nuclear ocurren en la fase folicular antes del pico de LH (Daguet, 1980). Durante la fase de GV0, la cromatina dispersa, característica de los ovocitos en la fase luteal, inicia una parcial condensación con agregados de cromatina irregulares alrededor del núcleo frente a la membrana nuclear (GV1). Según los estudios realizados por Motlik y Fulka (1986), los intervalos que se suceden desde la liberación de LH hasta la rotura de la vesícula germinal, tienen una duración aproximada de 20-24h y pueden dividirse en cuatro fases bien diferenciadas. Sobre las 8-10h posteriores a la exposición de LH, unos pocos agregados de cromatina se forman alrededor de la membrana nuclear (GV2), y a las 16h la mayoría de los ovocitos exhiben puntos de cromatina condensada y el comienzo de la formación de hebras (GV3). En la fase final, a las 20-24h después de LH, el nucleolo desaparece, la cromatina se condensa formando una red de bivalentes individuales y se produce la rotura de la membrana nuclear (GVBD).

Se han estado realizando diferentes estudios de fusión celular para comprender la relación entre el núcleo y el citoplasma durante el período anterior a la GVBD (Fulka *et al.*, 1986; Motlik y Fulka, 1986; Kubelka *et al.*, 1988). Estos estudios sugieren que los factores relacionados con la maduración (*MPF like factors*), alcanzan sus máximos niveles en los

ovocitos a las 8-16h después de la inducción de la maduración. Estos factores requieren la síntesis proteica para su activación o acumulación. Parece ser que la actividad de condensación cromosómica en los ovocitos porcinos está posiblemente localizada en el nucleoplasma, y no se libera al ooplasma hasta después de la rotura de la membrana nuclear.

La capacidad de progresión del estadio de vesícula germinal a estadio de MII, junto con la compactación nuclear y con el cese de la síntesis de ARN, ocurre cuando los ovocitos alcanzan su tamaño completo en el folículo antral. Más del 80% de los ovocitos de 100µm de diámetro (80% del tamaño completo) permanecen bloqueados en estadio de GV después de 24h de cultivo, mientras que todos los ovocitos totalmente desarrollados completan la rotura de la vesícula germinal (GVBD) durante el mismo periodo *in vitro* (Motlik *et al.*, 1984).

La capacidad para completar la transición de G2 a prometafase coincide con el cese de la actividad transcripcional del nucleolo, con la adquisición del tamaño completo y con la capacidad de sintetizar las proteínas propias del estadio de metafase (McGaughey *et al.*, 1979).

⇒ Ensamblaje del aparato meiótico; existen diversas proteínas asociadas en este proceso como la **MAPquinasa** y la **p90^{rsk}** que se encuentran siempre en áreas donde hay ensamblaje de microtúbulos (Lee *et al.*, 2000). Por otra parte se han descrito la **NuMA** y la **gamma-tubulina**; ambas se han visto asociadas en áreas cercanas a los cromosomas. NuMA ha sido observada en ambos polos del huso mitótico durante la MI, mientras que la gamma-tubulina se localiza entre el huso de microtúbulos (Sun *et al.*, 2001). Otras proteínas asociadas a este aparato meiótico son la *Polo-like* quinasa 1 (Yao *et al.*, 2003) y la CENP-E, una proteína motora de los cinetocoros (Lee *et al.*, 2000).

⇒ Detención en Metafase II; los ovocitos en estadio de MII presentan elevados niveles de MPF y actividad MAP quinasa; se ha estudiado que estos factores actúan como factores citostáticos (CSF, *cytostatic factors*) que mantienen a los ovocitos de los vertebrados, incluyendo los mamíferos en arresto meiótico. El MPF se conoce como un componente importante de los CFS en los ovocitos porcinos; este factor alcanza uno de sus máximos en estadio de MII, por lo que la habilidad de estos ovocitos para activarse depende de la disminución de la actividad de este factor (Kikuchi *et al.*,

2000). Además, la transición de estadio MII hacia anafaseII/telofaseII depende de la inactivación del MPF y degradación de la ciclina B (Miyano et al., 2000).

Recientes estudios sugieren que las MAP quinasa y la p90^{rsk} juegan un papel importante en la detención de ovocitos porcinos en estadio de MII (Fan et al., 2003).

1.1.1.3 Ovulación

El pico preovulatorio de LH, inducido por adecuados niveles de estradiol producido por los folículos preovulatorios, desencadena finalmente la ovulación.

En la especie porcina, la ovulación suele tener lugar 36-40h después del inicio del estro, tomando el pico preovulatorio de LH como día 0 del ciclo estral, y dura de 1 a 3 horas (Geisert, 1999); sin embargo, el inicio y la duración de la ovulación son muy variables (revisado por Flowers y Esbenshade, 1993). Los folículos que alcanzan un diámetro de 3-5 mm se consideran capacitados para ovular. Las paredes de estos folículos no están tensas, sino que se produce un descenso de la presión intrafolicular como consecuencia de alguna variación en sus propiedades (Hunter, 1967). De esta manera, en la cerda, la ovulación se produce por un ablandamiento y colapso provocada por la disociación enzimática de la pared folicular (Hunter, 1988), por ejemplo, por las colagenasas que disuelven la membrana basal y el estroma folicular durante la ovulación.

Los ovocitos se liberan del folículo preovulatorio o folículo de Graff como ovocitos secundarios en estadio de MII, revestidos por un número variable de células del *cumulus* y por líquido folicular viscoso. El número de ovocitos liberados es variable, oscilando entre 10 y 24 (Geisert, 1999).

1.1.1.4 Transporte del ovocito en el oviducto

El oviducto de los mamíferos proporciona el microambiente necesario para la captura, transporte y maduración final de los ovocitos ovulados; transporte, almacenamiento y capacitación de los espermatozoides; la

fecundación, y por último, las primeras divisiones del embrión (Hunter, 1988).

En el momento de la ovulación, la fimbria del oviducto envuelve al ovario, capturando el contenido de los folículos, es decir, los ovocitos rodeados por sus células del *cumulus oophorus* y una pequeña cantidad de fluido folicular viscoso. Estos ovocitos se disponen en la ampolla oviductal a través de la cual son transportados hacia el lugar de fecundación, en la unión ampular ístmica. Todo el proceso descrito dura unos 24-30 minutos (Hunter, 1989) y posteriormente, los cigotos migran o son transportados hacia el útero.

Al transporte de los ovocitos contribuyen las ondas de contracción peristáltica en el miosálpinx, el batido ad-ovárico de los cilios que revisten la ampolla y los movimientos del mesosálpinx (Hunter, 1989). Durante la citada fase de transporte se produce una maduración final del ovocito secundario y, efectivamente, podría preverse algún tipo de cambio de membrana teniendo en cuenta la diferencia entre los "medio ambientes" folicular y tubárico (Hunter, 1989). La adhesión de glicoproteínas oviductales (oviductinas) a la ZP es quizás uno de los cambios mas importantes (Hunter, 1989).

En el caso de la cerda, los ovocitos empiezan a degenerar a las 8 horas postovulación aunque el animal puede seguir presentando conducta típica de celo y ser receptivo al macho. Los ovocitos no fecundados degeneran en el útero por reblandecimiento y distorsión de la zona pelúcida (Hunter, 1982).

1.1.2 MADURACIÓN IN VITRO (MIV)

Las secuencias detalladas de los eventos que ocurren durante el crecimiento del ovocito *in vivo* deben imitarse lo máximo posible, mediante técnicas diseñadas para soportar el crecimiento folicular y ovocitario *in vitro*.

1.1.2.1 Duración y condiciones de cultivo

El tiempo de cultivo necesario para obtener ovocitos madurados *in vitro* en el estadio nuclear de MII es bastante aproximado al requerido *in vivo*. La duración del cultivo durante la MIV de los ovocitos porcinos oscila desde 36h (Yoshida *et al.*, 1993; Ka *et al.*, 1997) hasta 48h (Naito *et al.*, 1988), pasando por 40h (Funahashi y Day, 1993), 44h (Galeati *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1997; Rath *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1997), 46h (Eng *et al.*, 1986; Kikuchi *et al.*, 1993) o incluso 50h (Kim *et al.*, 1998). Según Ka *et al.* (1997) un cultivo de 36h es suficiente para completar los procesos de maduración nuclear y citoplasmática, mientras que Yamauchi *et al.* (1996) apuntan que el periodo óptimo de cultivo es de 42-44h. Recientemente, otros autores apuntan a la necesidad de reducir los tiempos de maduración para conseguir una mejor calidad ovocitaria, ya que se ha observado que los ovocitos más viejos tienen menor capacidad de ser fecundados que los jóvenes, debido a la menor cantidad de quinasa H1 (Stumpf *et al.*, 1994) y a la menor cantidad de la forma activada del MPF (Kikuchi *et al.*, 2000).

Las condiciones físicas específicas del ambiente en el que maduran los ovocitos (osmolaridad, pH y composición iónica del medio, temperatura y tensión de CO₂ y O₂ del incubador, volumen de cultivo y tiempo de incubación), así como la mayor o menor definición del medio de maduración utilizado (suero, células somáticas, etc.) van a influir en el resultado final (Holm y Callesen, 1998).

La temperatura de incubación más utilizada, tanto en la MIV como en la fecundación *in vitro* (FIV) y el cultivo de embriones (CE) se encuentra cercana a la temperatura corporal de la cerda que es de 39°C. Se han realizado diversas investigaciones a temperaturas de 37°C (Naito *et al.*, 1988) pero la temperatura más utilizada es de 38.5°C (Yoshida *et al.*, 1992, 1993; Liu *et al.*, 1997) o de 39°C (Galeati *et al.*, 1991; Zheng y Sirard, 1992; Rath *et al.*, 1995; Sawai *et al.*, 1997). 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.

1.1.2.2 Medios de cultivo y suplementos

Para la maduración *in vitro* de los ovocitos porcinos, se han estado empleando diferentes medios de cultivo dependiendo del propósito de estudio o del grupo de trabajo. Los medios se pueden clasificar en sencillos o complejos en función de la diversidad de componentes. Entre los medios de cultivo **sencillos** ampliamente utilizados en la MIV porcina se encuentra el medio *Whitten's* (Funahashi *et al.*, 1994; Coy *et al.*, 1996; Ka *et al.*, 1997) el medio KRB (Krebs Ringer Bicarbonato; Naito *et al.*, 1988) y el medio NCSU (*North Carolina State University*; Abeydeera *et al.*, 1998). Estos medios se suelen preparar en el propio laboratorio. Dentro de los medios de MIV **complejos** podemos destacar el TCM199 (*Tissue Culture Medium* 199; Zheng y Sirard, 1992; Rath *et al.*, 1995; Coy *et al.*, 1999) y el *Waymouth* (Yoshida *et al.*, 1993, Kikuchi *et al.*, 1999; Coy *et al.*, 1999). Éstos, a diferencia de los anteriores, se suelen adquirir en preparados comerciales debido a su elevado número de componentes.

A su vez, los medios de cultivo se dividen en definidos o indefinidos, conforme el tipo de suplementación que presenten. La tendencia actual es, en la medida de lo posible, el uso de medios con suplementos definidos. De esta manera, no se presentan posibles factores desconocidos que podrían interferir en la regulación de los procesos de estudio (Abeydeera, 2002).

Los suplementos varían de igual forma dependiendo del objetivo de la investigación y de los laboratorios. Se sabe que durante el proceso de MIV en muchas especies intervienen mayoritariamente la suplementación de proteínas y de hormonas.

Dentro de los suplementos más utilizados se encuentran:

- Fluido folicular porcino (**PFF**). Es el fluido fisiológico que llena el antro folicular y baña al ovocito en condiciones *in vivo*. Su empleo está extendido entre numerosos autores (Yoshida *et al.*, 1993; Rath *et al.*, 1995; Coy *et al.*, 2002, Matás *et al.*, 2003). Yoshida *et al.* (1992) demostraron que el fluido folicular contenía una sustancia ácida que promovía la maduración ovocitaria. El PFF procedente de folículos de 3 a 6mm de diámetro aporta al medio de cultivo no sólo proteínas sino también una cantidad basal de gonadotropinas y estradiol (Funahashi y Day, 1993). Se ha probado que su adición al medio aumenta los porcentajes de maduración

nuclear (Yoshida *et al.*, 1992), promueve significativamente la formación del pronúcleo masculino y la expansión de las células del *cumulus*.

- Suero fetal bovino (**FCS**) y albúmina sérica bovina (**BSA**), que se utilizan como fuentes proteicas. El suero se ha visto que estimula la expansión del *cumulus* (Daen *et al.*, 1994), aunque algunos autores observan un efecto perjudicial de este FCS en la formación de pronúcleo masculino (Funahashi y Day, 1993). El uso de la BSA presenta disparidad de opiniones (Yamauchi *et al.*, 1996; Zheng y Sirard, 1992). Se han descrito similares porcentajes de maduración nuclear con medios suplementados con BSA frente a FCS. Sin embargo, el estudio realizado por Zheng y Sirard muestra que el suplemento proteico de BSA no sustenta la expansión del *cumulus* ni la maduración de los ovocitos porcinos como lo hace el FCS.

- **Glutation (GSH), cisteína (Cys)** y otros compuestos con grupos tioles. Estos factores protegen al ovocito contra los efectos nocivos de las especies reactivas de oxígeno generadas durante las condiciones de cultivo, manteniendo un ambiente de óxido-reducción adecuado (Meister y Anderson, 1983). Por otra parte, favorecen la formación del pronúcleo masculino (PNM) reduciendo los puentes disulfuro de las protaminas del ADN espermático. Este importante papel del GSH sobre la formación del PNM ha llevado a algunos autores a utilizar la concentración intracelular de GSH al final de la maduración, como un medidor de la maduración citoplasmática del ovocito (Yoshida *et al.*, 1993b; Funahashi *et al.*, 1994a, 1996; Coy *et al.*, 1999).

- **Gonadotropinas**. Este suplemento es uno de los factores decisivos en la MIV (Zheng y Sirard, 1992), ya que mejora la maduración nuclear y la expansión del *cumulus*. Además, ejercen una acción positiva sobre la formación del PNM (Wang y Niwa, 1995). Existen diferentes combinaciones de gonadotropinas y estradiol: eCG-hCG (Abeydeera *et al.*, 1998); eCG-hCG-estradiol (Funahashi y Day, 1993), FSH-LH (Mori *et al.*, 2000), FSH-LH-estradiol (Zheng y Sirard, 1992).

- Factor de crecimiento epidérmico (**EGF**). Este factor presenta un papel regulador, tanto autocrino como paracrino, en las funciones ováricas. Su acción parece estar mediada por la unión a receptores presentes en las células del *cumulus* (Coskum y Lin, 1992) estimulando la producción de

ácido hialurónico y su retención en la matriz extracelular de las células del *cumulus* expandidas (Prochazka *et al.*, 1998).

1.1.2.3 Problemática actual

Uno de los principales problemas que presentaba la MIV de los ovocitos porcinos era la baja formación del **PNM**. Yoshida *et al.*, en 1993, demostraron que durante la maduración *in vitro* del ovocito se produce síntesis intracelular de glutatión y que éste es un importante factor citoplasmático para regular la descondensación espermática y la formación del pronúcleo masculino tras la penetración. Al parecer, el glutatión es necesario para la reducción de los puentes disulfuro de la protamina espermática requerida para iniciar la descondensación. Diferentes estudios han demostrado que la utilización de medios con bajo contenido en sal, la adición de fluido folicular y la adición de cisteína al medio de maduración incrementa el contenido en glutatión del ovocito y, en consecuencia, mejoran su capacidad de formación del pronúcleo masculino (Funahashi *et al.*, 1994; Yoshida *et al.*, 1992; Yoshida *et al.*, 1993). Así, este problema ha sido hoy en día resuelto gracias a la aplicación de una serie de modificaciones en las condiciones de maduración, fundamentalmente consistentes en la adición de cisteína, cisteamina y glutamina al medio de maduración (Coy y Romar 2002; Funahashi, 2003). En la actualidad, la medición del contenido intracelular de GSH en los ovocitos se utiliza como un muy buen indicador de maduración citoplasmática, y cuando se modifican los tratamientos de MIV para conseguir mejoras, es necesario medir este parámetro para valorar si la formación del pronúcleo masculino se verá afectada por las modificaciones introducidas.

Otro de los problemas presentes, además del grado de maduración cuando se utilizan ovocitos no ovulados fisiológicamente, es el hecho de que algunos ovocitos/folículos están programados para muerte celular o **apoptosis** dando lugar a la atresia de éstos (Kane, 2003). Un porcentaje de folículos presentes en el ovario se encuentran en diferentes estadios de atresia (Markström *et al.*, 2002). Probablemente, este proceso de apoptosis comience en el folículo y posteriormente afecte al ovocito. Existen evidencias de que complejo *cumulus*-ovocito (COCs) de buena calidad, aislados de folículos que presentan un grado elevado de apoptosis en sus paredes, pierden su capacidad de desarrollo posterior (Jewgenow *et al.*, 1999). En el ovario existen diferentes reguladores específicos de la

apoptosis, incluyendo hormonas, factores de crecimiento y citoquinas (Markström *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha estudiado recientemente una relación entre el grado de atresia presente en el *cumulus* y la competencia ovocitaria; un menor grado de atresia está asociado con ovocitos de elevada capacidad de desarrollo (Hendriksen *et al.*, 2000).

El principal problema en el estudio de la atresia relacionada con la capacidad de desarrollo ovocitaria es que no existen criterios macroscópicos que nos permitan seleccionar y clasificar los folículos de acuerdo a su estado de salud. Los criterios normalmente utilizados para la determinación de la atresia son bioquímicos y no nos permiten su uso previo a la MIV (Mermillod *et al.*, 1999). Grimes e Ireland (1986), en la especie bovina, sugieren que la apariencia de la superficie de los folículos puede ser utilizada como criterio de selección de los futuros ovocitos y así, mejorar los índices de maduración *in vitro*. Estos autores proponen la clasificación de los folículos en dos categorías: folículos claros y folículos opacos. En este estudio, se demuestra que los ovocitos provenientes de folículos claros muestran tasas de maduración *in vitro* significativamente superiores a los ovocitos provenientes de los folículos opacos. También puede establecerse que los folículos claros tienen en su contenido menor concentración de estrógenos, progesterona y fluido folicular que los opacos.

Existen evidencias en algunas células de que la activación de la proteína quinasa-C inhibe la apoptosis (Kane, 2003), y es posible que pueda utilizarse este sistema de activación para inhibir la apoptosis y de esta manera mejorar los porcentajes de maduración ovocitaria.

Del mismo modo, las futuras innovaciones en los sistemas de MIV van encaminadas a la corrección de otro problema como es la **maduración citoplasmática**, que se ve asociada a la capacidad de desarrollo posterior. Los ovocitos madurados *in vitro* presentan una capacidad de desarrollo inferior a los madurados *in vivo* (Rodríguez y Farin, 2004).

Cuando el ovocito es liberado del ambiente folicular y transferido a un medio de maduración adecuado, en varias horas (dependiente de especie), este ovocito alcanza el estadio de MII y está listo para ser fecundado (Staigmiller y Moor, 1984). A pesar de que los ovocitos maduros a nivel del núcleo pueden ser fecundados, éstos pueden ser incompetentes en el desarrollo posterior, debido a deficiencias en ciertos factores citoplasmáticos

necesarios para la completa maduración. Por ejemplo, las condiciones en las que se produce la maduración *in vitro* pueden causar movimientos incompletos de las mitocondrias en el citoplasma del ovocito, y por lo tanto, afectar a la maduración posterior (Sun *et al.*, 2001).

Una incompleta maduración citoplasmática puede dar lugar a fallos durante la fecundación incluyendo la polispermia y una asincronía en la formación pronuclear (Mattioli *et al.*, 1988; Moor *et al.*, 1990) que se conocen como uno de los principales problemas de la baja capacidad de desarrollo de los ovocitos madurados y fecundados *in vitro* (Hunter, 1991).

La adquisición de la capacidad de desarrollo ocurre durante el crecimiento del ovocito dentro del folículo y tiene lugar en diferentes estadios de desarrollo folicular (Mermillod *et al.*, 1999). Los ovocitos que no completen la capacitación no serán competentes en el desarrollo posterior aunque sean capaces de reanudar la meiosis y ser fecundados. Diversos tipos de inhibidores (fisiológicos y químicos) se han estado empleando para inhibir la reanudación de la meiosis e intentar mimetizar lo que ocurre en el interior del folículo en crecimiento, dando tiempo al ovocito a acumular transcritos y mejorar su calidad citoplasmática.

1.1.2.4 Inhibidores meióticos

En la mayoría de los sistemas de MIV, los ovocitos se obtienen por aspiración de folículos de tamaño medio (3-7mm) de ovarios procedentes de matadero. Se ha observado una amplia variabilidad en la morfología nuclear de la GV (Funahashi *et al.*, 1997a) que podría influir en la progresión meiótica, maduración citoplasmática y posterior desarrollo embrionario (Abeydeera, 2002) del ovocito. Por el contrario, la morfología nuclear del estadio de GV está muy sincronizada en las cerdas en el momento del pico preovulatorio de la LH (Funahashi *et al.*, 1997a). Estos mismos autores observaron que la exposición de los ovocitos durante las 20 primeras horas de MIV a un medio con dibutilil-adenosínmonofosfato cíclico ($dbAMP_c$) aumentaba la homogeneidad de la maduración nuclear de los ovocitos. Además, el porcentaje de blastocistos se incrementaba notablemente con respecto al control. Eppig y Downs (1984) estudiaron que las purinas podían mantener el arresto meiótico dada su capacidad para inhibir las fosfodiesterasas, incrementando de esta manera los niveles de AMPc intraovocitarios. También es posible mantener a los ovocitos en

arresto meiótico tratándolos con inhibidores de la fosfodiesterasas (PDE *Phosphodiesterase inhibitors*), que previenen la degradación de AMPc (Sirard, 2001). Además, se ha visto que la hipoxantina presente en el fluido folicular produce una inhibición temporal en la maduración de los ovocitos bovinos (Sirard, 2001).

El estadio de GV es muy importante para los procesos de transcripción y traducción, no sólo para las moléculas específicas de estadio necesarias para la GVBD (Khatir *et al.*, 1998), sino también para la síntesis y almacenamiento de proteínas y transcritores que juegan un papel muy importante en el desarrollo embrionario posterior.

Diversos autores (Avery y Greve, 1997; Lonergan *et al.*, 1997; Mermillod *et al.*, 2000) sugieren que si los ovocitos son cultivados *in vitro* en presencia de inhibidores meióticos reversibles manteniéndolos en el estadio de GV antes del período de maduración, estos ovocitos podrían tener más posibilidades para completar el proceso de capacitación ovocitaria que tiene lugar *in vivo* (Hyttel *et al.*, 1997), y de esta manera adquirir mayor capacidad de desarrollo. El objetivo es darle al ovocito tiempo adicional para sintetizar y/o modificar y almacenar proteínas y ribonucleoproteínas de nueva síntesis que puedan posteriormente incrementar la capacidad de desarrollo.

En este sistema de maduración, los ovocitos se cultivan en presencia de inhibidores de la reanudación meiótica que actúan de manera reversible para posteriormente transferirse al medio adecuado para completar la maduración. Hay diferentes métodos de inhibición de la meiosis. Unos están basados en inhibidores fisiológicos como son las paredes foliculares (Carbonneau y Sirard, 1994), células murales de la granulosa homóloga y heteróloga (Kalous *et al.*, 1993; van Tot *et al.*, 1996), células de la teca (Richard y Sirard, 1996), o el cultivo de folículos antrales intactos (Foulady Hashta *et al.*, 1998). Otros están basados en el uso de inhibidores químicos. Entre éstos se encuentran la **cicloheximida** que es un inhibidor de la síntesis proteica (Lonergan *et al.*, 1997; Saeki *et al.*, 1997), la 6-dimetilaminopurina (**6-DAMP**) un inhibidor no específico de la fosforilación (Fulka *et al.*, 1991; Lonergan *et al.*, 1997; Saeki *et al.*, 1997; Avery *et al.*, 1998), el 5,6-didoro-1-b-dibofuranosilbenzimidazol (**DRB**) un inhibidor transcripcional (Rodríguez y Farin, 2004), la butirolactona I (**BL-1**) un componente natural que inhibe las quinasas ciclo-dependientes y tiene

también efecto inhibitor en otras proteínquinasas como la MAP quinasa (Motlik *et al.*, 1998; Lonergan *et al.*, 2000; Kubelka *et al.*, 2000), la roscovitina (ROS), una purina conocida por inhibir específicamente en numerosos sistemas celulares el MPF con actividad quinasa (Mermillod *et al.*, 2000; Kasinathan *et al.*, 2001; Meijer y Raymond, 2003) y por último combinaciones de estos inhibidores químicos como la combinación de BL-I más ROS (Ponderato *et al.*, 2001).

Estudios de cocrystalización indican que la BL-I y la ROS presentan el mismo sistema de inhibición, compitiendo por el paquete de unión de la cdc2 quinasa al ATP y por lo tanto, bloqueando la actividad fosforilativa (Kubelka *et al.*, 2000; Motlik *et al.*, 2000).

La roscovitina es un potente inhibidor de MPF, que se ha comprobado que puede inhibir un menor número de kinasas que la 6-DAMP pero con una mayor especificidad por su competencia con el sitio de unión al ATP de la subunidad catalítica cdc2. Mermillod *et al.*, (2000) mostraron en la vaca que utilizando la ROS a concentraciones de 25 μ M se bloqueaba eficientemente la reanudación de la meiosis durante 24h de cultivo. Este efecto inhibitorio fue completamente reversible, ya que el 89% de los ovocitos tratados con ROS, y cultivados posteriormente en ausencia de inhibidor durante las siguientes 24h, alcanzaron el estadio de MII. Los primeros estudios de maduración con ROS en ovocitos porcinos fueron realizados por Krschek y Meinecke en 2001 utilizando diferentes concentraciones de este inhibidor. Estos autores demostraron que la ROS a concentración de 50 μ M durante 48h bloqueaba la actividad de la histona H1 y parcialmente, prevenía la activación de la MAP quinasa. Del mismo modo, cultivando los ovocitos durante un período de 30h observaron que esta inhibición era reversible. En 2003, Ju *et al.* demostraron una interacción entre la duración y la concentración de la ROS. Recientes estudios en ovocitos porcinos demuestran que la ROS a 50 μ M durante un período de 24h es efectiva en el mantenimiento de los ovocitos en estadio de GV, y esta inhibición desaparece al cultivar los ovocitos en el medio de MIV adecuado (Coy *et al.*, 2003). En el 2004, se han obtuvieron los primeros lechones mediante el uso de ovocitos premadurados con ROS y fecundados *in vitro* (Coy *et al.*, 2004, 2005).

1.2 FECUNDACIÓN

1.2.1 FECUNDACIÓN IN VIVO

La fecundación es el proceso por el cual dos células altamente diferenciadas, ovocito y 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 fecundación de ovocitos porcinos tiene lugar unas pocas horas después de la ovulación, en la unión ampular ístmica del oviducto (Hunter, 1991).

Para ello, es necesario que tanto el ovocito como el espermatozoide experimenten las modificaciones que den lugar a la formación de un cigoto viable.

1.2.1.1 Capacitación espermática

Los espermatozoides recién eyaculados no son capaces de fecundar, por lo que deben sufrir una serie de cambios denominados tradicionalmente como capacitación espermática (Austin y Chang, 1951). Este proceso consiste básicamente en modificaciones bioquímicas de la membrana plasmática y en el cambio de movimiento del flagelo espermático, proceso conocido como hiperactivación espermática (Yanagimachi, 1994). Durante este proceso, el espermatozoide sufre los cambios necesarios que le permitirán más tarde la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa. La capacitación espermática tiene lugar durante el paso de estas células a través del tracto genital femenino. En el cerdo, el espermatozoide necesita de 5 a 6h en el interior del tracto genital femenino para adquirir la capacidad de penetrar al ovocito (Polge, 1978).

El colesterol y el sulfato de colesterol de la membrana de los espermatozoides limitan la permeabilidad iónica de la misma y la inserción y movilidad de las proteínas dentro de la bicapa lipídica, brindando de este modo 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 sulfato, lo que desestabiliza la bicapa fosfolipídica y permite la

activación acrosomal. Todo ello da lugar a una modulación de la fluidez de la membrana espermática, salida de colesterol, con aparición de zonas de alta fluidez pobres en proteínas 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 acrosómica. Al mismo tiempo tiene lugar la fosforilación de determinadas proteínas, entre ellas la tirosina mediante una proteínquinasa A (Breitbart, 2002).

En el cerdo, sólo unos pocos miles de espermatozoides alcanzan la región ístmica, y sólo un pequeño número llega al lugar de fecundación (Hunter, 1991), minimizando de este modo las posibilidades de fecundación polispérmicas y asegurándose un número óptimo de espermatozoides en el lugar y momento de la unión al ovocito. Este proceso capacitante se inicia mientras los espermatozoides pasan por el cérvix o cuello uterino, se continúa posteriormente en el útero y se completa en el oviducto a nivel de la ampolla.

1.2.1.2 Reconocimiento y fusión de gametos

Una vez que los espermatozoides alcanzan el lugar de fecundación, éstos tienen que atravesar las barreras que presenta el ovocito, entre las que se encuentran las células del **cumulus**, la **ZP** y la **membrana plasmática**.

Los espermatozoides deben estar parcialmente capacitados y no reaccionados (acrosoma intacto) para poder atravesar las células del **cumulus**. Se sabe que únicamente los espermatozoides capacitados se mueven libremente dentro de la matriz del **cumulus**, mientras que los no capacitados se unen a la superficie pero no pueden atravesarla (Myles y Primakoff, 1997).

Se ha estudiado una proteína llamada PH20 (Myles y Primakoff, 1997) que tiene actividad hialuronidasa, gracias a la cual el espermatozoide es capaz de hidrolizar el ácido hialurónico y atravesar la densa capa del **cumulus** ayudado por su movimiento hiperactivo.

Una vez atravesadas las células del *cumulus*, el espermatozoide tiene que unirse y atravesar la **ZP**. Esta unión está mediada por la interacción entre moléculas con gran afinidad presentes en la superficie tanto del espermatozoide como del ovocito. Existen dos tipos de uniones. En la unión primaria, considerada relativamente específica de especie, la glicoproteína ZP3 del ratón (o equivalente en otra especie) de la zona pelúcida se une a proteínas presentes en la membrana plasmática del espermatozoide capacitado y no reaccionado. En este proceso juegan un papel importante los carbohidratos de estas glicoproteínas como son la manosa, fucosa y ácido siálico. 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 la proteína de unión GTP y de la fosfolipasa C (PLC). De esta manera, se produce una elevación del calcio citoplasmático del espermatozoide. 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 acrosómica. El espermatozoide reaccionado permanece unido a la ZP2 gracias al enzima proacrosina que se encuentra anclada a la membrana acrosomal interna. Los espermatozoides que no reconozcan y se unan a las glicoproteínas de la ZP sufriendo la reacción acrosómica no fecundarán al ovocito (Töpfer-Petersen *et al.*, 2000).

Tras la reacción acrosómica y la unión secundaria a la ZP, el espermatozoide atraviesa el espesor de la ZP para alcanzar el espacio perivitelino. Tan pronto como la cabeza espermática se adhiere firmemente a la superficie del ovocito, la motilidad residual del flagelo fuerza a éste a rotar dentro de la zona hasta que se incorpora totalmente al espacio perivitelino, momento en que la motilidad disminuye bruscamente y la rotación cesa (Gaddum-Rose, 1985). 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 este punto la fusión entre ambas membranas (Moore y Bedford, 1983). El espermatozoide se incorpora en su totalidad dentro del ooplasma. La región posterior de la cabeza, junto con el flagelo, se internalizan mediante fusión de membranas, mientras que la porción anterior se engloba por fagocitosis (Gaddum-Rose, 1985). En el proceso de fusión se conocen diferentes proteínas asociadas; éstas pertenecen a la familia ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*) y entre ellas destacan la fertilina y ciritestina (Primakoff y Myles, 2002). La fertilina y ciritestina son proteínas

que se expresan en los testículos y se localizan en la cabeza del espermatozoide. La fertilina es un heterodímero y la cristestina (ADAM3) está compuesta de un solo polipéptido (Cuasnicú *et al.*, 2001; Heinlein *et al.*, 1994) que parece que media en el anclaje del espermatozoide a la membrana plasmática del ovocito. Una subunidad de la fertilina, a través de un péptido presente en la molécula, se ha propuesto que participa en la fusión.

1.2.1.3 Activación del ovocito

La fusión de las membranas de ambos gametos desencadena la activación del ovocito (Yanagimachi, 1994) 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 posterior transformación del ovocito en un embrión capaz de desarrollarse (Ben-Yosef y Shalgi, 2001).

a) Mediadores celulares en la activación

⇒ En todos los mamíferos se sabe que el **ion calcio** (Ca^{+2}) participa como segundo mensajero en la cascada de eventos que conducen a la activación. El incremento en la concentración de calcio intracelular ocurre entre los tres primeros minutos de la fusión de membranas y se presenta como en oleadas desde la entrada espermática (Ben-Yosef y Shalgi, 2001). El Ca^{+2} se incrementa desde niveles basales de 50-100nmol/l hasta 600-1000nmol/l dependiendo de la especie (Miyazaki *et al.*, 1993). El retículo endoplasmático se reconoce como el lugar de almacenamiento y liberación de calcio, y en él se encuentran los receptores del inositol 1,4,5-trifosfato ($\text{InsP}_3\text{-R}$). La primera entrada de calcio es seguida por una serie de cortas entradas 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 fecundación, la amplitud y frecuencia de los inlfujos 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).

El incremento intracelular de calcio induce la **reacción cortical** en el ovocito. Los **gránulos corticales** (GC) son vesículas secretoras formadas durante estadios tempranos de la ovogénesis. Están localizadas en la región cortical del ovocito, y contienen enzimas y material glicosilado. Durante la activación se produce la reacción cortical y el contenido de estos gránulos se libera al espacio perivitelino modificando las glicoproteínas de la ZP, de tal modo que ésta se torna "refractaria" a la penetración espermática, proceso denominado "reacción de zona" (Yanagimachi, 1988). De esta manera se establece parte del bloqueo a la polispermia. Existen evidencias, actualmente en fase de investigación, de que el bloqueo de la ZP a la entrada de espermatozoides no se basa en un único mecanismo, sino que parecen estar involucrados fenómenos de proteólisis, reconocimientos de residuos glúcidos y formación de puentes disulfuro en la ZP (Benoff, 1997).

También existen evidencias de bloqueo a nivel de la membrana plasmática de los ovocitos de algunos mamíferos como el conejo (Yanahimachi, 1994), pero el mecanismo por el cual esta membrana se bloquea es desconocido pudiendo actuar o no los GC.

Por otra parte, este aumento de Ca^{+2} también produce la **reanudación de la meiosis**. Los ovocitos de mamíferos como explicamos anteriormente quedaban en arresto meiótico (MII) una vez ovulados. Este arresto es debido a la presencia de elevadas cantidades del MPF responsable del ensamblaje del huso, condensación de la cromatina y rotura de la envoltura nuclear (Williams, 2002). Durante la MII este factor permanece activo debido a la presencia del factor citostático que previene la degradación de la ciclina B1. La elevación del Ca^{+2} intracelular producido por el espermatozoide induce la degradación de la ciclina (Lorca *et al.*, 1993) mediante la pérdida del factor citostático activo, y de esta manera la cromatina ovocitaria entra en anafase II (Williams, 2002).

Otra proteínquinasa importante en la regulación del ciclo meiótico es la MAP quinasa. Este grupo de proteínas se encargan de la fosforilación de proteínas cromosómicas importantes en el mantenimiento de la cromatina condensada durante la transición de fases MI a MII. Al mismo tiempo, previenen la formación de la envoltura nuclear mediante la fosforilación de láminas nucleares (Williams, 2002). Durante la activación del ovocito, la actividad de las MAP-quinasas decrece; este descenso es necesario para que se pueda formar la envoltura nuclear (Moos *et al.*, 1995).

Durante la activación también se producen cambios en el patrón de síntesis proteica (Latham *et al.*, 1991), los cuales resultan en parte del reclutamiento de ARNm materno que está presente en el citoplasma del ovocito pero no se traduce antes de la activación ovocito, y por otra parte de modificaciones post-traduccionales producidas en las proteínas existentes. Finalmente, el comienzo de la transcripción y traducción de las proteínas codificadas por el nuevo genoma embrionario tiene lugar en el estadio de dos células en ratón, y durante estadios tardíos preimplantatorios en la especie humana; este proceso se conoce como activación de los genes del embrión.

⇒ Además del Ca^{+2} , se sabe que el **pH** también participa en los eventos de la activación. La fecundación en diferentes especies va acompañada por una alcalinización. Se ha especulado que las enzimas que se activan mediante el Ca^{+2} necesitan un ambiente adecuado de elevado pH para actuar (Ben-Yosef y Shalgi, 2001).

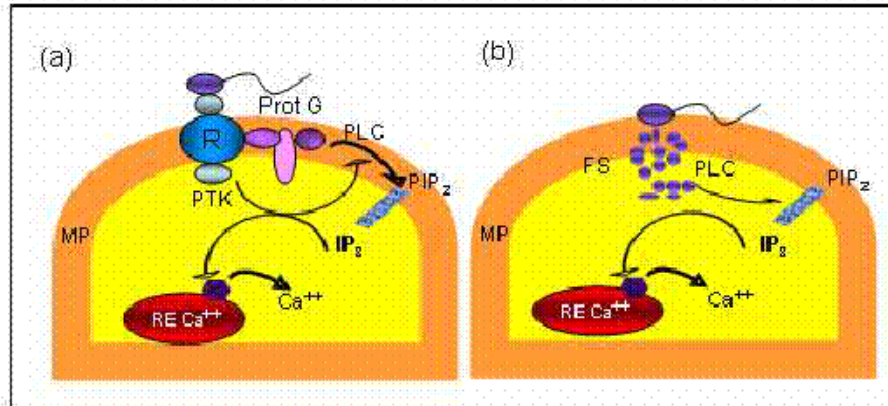
⇒ El **InsP_3** también se conoce como segundo mensajero en la activación. Este factor se produce por la hidrólisis del fosfatidil-inositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) mediante una fosfolipasa C específica de fosfoinositoles (PLC). La liberación de calcio durante la activación es inducida por la acción del InsP_3 sobre sus receptores $\text{InsP}_3\text{-R}$ presentes en los almacenes de calcio del retículo endoplasmático. Y además, está mediada por un mecanismo de retroalimentación positivo que provoca más liberación del catión del retículo endoplasmático, la cual se revierte a determinadas concentraciones de Ca^{+2} . Este cierre de los canales de los $\text{InsP}_3\text{-R}$ permite la re-entrada de calcio citoplasmático mediante la actividad de ATPasas del retículo endoplasmático (RE) dependientes de Ca^{+2} y vuelta a los niveles basales de Ca^{+2} . Esto coincide con las oscilaciones de Ca^{+2} anteriormente citadas. Se sabe que aunque un incremento de calcio es suficiente para producir la activación, las oscilaciones son necesarias para posteriores eventos de desarrollo (Tesarik y Mendoza, 1999).

⇒ **sn-1,2 diacilglicerol (DAG)** provocado por la hidrólisis del PIP_2 . Este factor causa la activación de la proteína quinasa C (PKC) que tiene diferentes efectos en las células somáticas (Williams, 2002).

b) Modelos de activación

Se han propuesto dos modelos en la activación ovocitaria (Figura 3).

FIGURA 3. (a) Activación mediada por receptor. (b) Activación mediada por factor espermático.



Activación mediada por receptor (figura 2a). La unión del espermatozoide mediante ligandos a los receptores específicos del oolema (MP) produce una señal de transducción que media en la cascada de los eventos celulares. Este reconocimiento entre el espermatozoide y el receptor del ovocito es análogo a las uniones entre los receptores de las células somáticas con las respectivas hormonas. Se ha sugerido que el espermatozoide se puede unir a un receptor acoplado a la proteína G (Prot G) o a un receptor tirosínquinasa (R). Ambos receptores están presentes en el oolema y median en la activación artificial. La unión a estos receptores de membrana provoca la activación de una fosfolipasa C (PLC), y ésta al ser activada interviene en el paso de fosfoinositol bifosfato (PIP_2) a InsP_3 y diacilglicerol (DAG).

Activación por factor espermático (figura 2b). Es la más aceptada en la actualidad (Williams, 2002). La fusión entre el espermatozoide y el ovocito permite la liberación de un componente espermático (FS) en el interior del ooplasma que es capaz de inducir los eventos tempranos de la cascada de la activación. Además, la inyección de extractos espermáticos en el interior de ovocitos induce el incremento inicial de Ca^{+2} , con las correspondientes oscilaciones de Ca^{+2} posteriores y una completa activación seguida por el desarrollo hasta estadio de blastocisto. Sousa et

al. (1996) observaron que las oscilaciones de calcio persisten durante varias horas a través de estudios realizados mediante la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), mientras que no se observaron estas oscilaciones en los ovocitos inyectados sin espermatozoides (*sham*) demostrando el papel del factor espermático en el proceso de la activación.

Se sabe que este factor espermático es una proteína sensible al calor (Swann, 1990). Este factor, que se dispone en la cabeza espermática debe inducir oscilaciones de calcio similares a las producidas durante la fecundación y debe inducir la liberación de calcio del RE vía InsP_3 -R.

Se han estudiado diferentes procedencias de este factor. Inicialmente se postuló que era una proteína de 30-100kDa denominada oscilina (Parrington *et al.*, 1996), pero más tarde se demostró que no tenía actividad para producir oscilaciones de calcio (Wolny *et al.*, 1999). Otro candidato fue el receptor c-kit (Sette *et al.*, 1997) pero se vio de igual manera que no producía oscilaciones repetitivas en el ovocito. Más tarde, se pensó en la PLC como factor espermático (Jones *et al.*, 1998) y se aislaron diferentes isoformas, pero ninguna coincidía con la actividad del factor espermático (Parrington *et al.*, 2002). Aunque primeramente se postuló en un factor soluble, se descubrió que éste se localizaba en la periteca (PT) del espermatozoide (Perry *et al.*, 2000). Recientemente se ha clonado una proteína de la PT conocida como PT32 de 32kDa que se presenta como el candidato del factor espermático (Williams, 2002). Esta proteína tiene localización post-acrosomal siendo una de las primeras partes de la PT expuestas al citoplasma del ovocito. Es fácilmente extraíble mediante procesos de congelación-descongelación espermática o mediante agentes reductores. Se ha visto que esta proteína recombinada es capaz de inducir la activación en ovocitos porcinos. Aún así se requieren más estudios (Williams, 2002).

1.2.1.4 Formación de pronúcleos y singamia

Una vez en el interior del ovocito, se produce la separación de la cola de la cabeza espermática durante la formación del pronúcleo masculino (PNM). A continuación, tiene lugar la pérdida de la membrana nuclear del espermatozoide de modo que la cromatina queda expuesta directamente al

citoplasma del ovocito. Esta cromatina sufre un proceso de descondensación que se inicia en la región posterior de la cabeza y continua hasta la región anterior (Terada *et al.*, 2000). La descondensación se produce mediante la reducción de los puentes disulfuro de las protaminas y es llevada a cabo por el glutatión reducido presente en el ooplasma del ovocito (Yanagimachi, 1994). Posteriormente, comienza la sustitución de protaminas por histonas y se forma una nueva envoltura nuclear, dando lugar al PNM. Las mitocondrias procedentes del espermatozoide son degradadas mientras que las mitocondrias maternas pasan a la siguiente generación.

El factor que controla la formación del PNM se conoce como factor de crecimiento del PNM (Thibault *et al.*, 1987) y aparece en el ovocito durante la fase final de su maduración (Ding *et al.*, 1992)

Por otra parte, y tras la extrusión del segundo corpúsculo polar (CP), el genoma haploide materno también sufre un proceso de descondensación, se forma la membrana nuclear y queda constituido el pronúcleo femenino (PNF). La síntesis de ADN comienza simultáneamente en ambos PN.

Una vez formados, ambos pronúcleos comienzan a migrar hasta que aproximadamente a las 5-6h de la penetración espermática tiene lugar la aposición central de los mismos, se desintegran sus membranas nucleares y sus pares de cromosomas homólogos se asocian antes de efectuar la primera división mitótica (Hunter, 1988). Este proceso de unión o singamia, está relacionado con el citoesqueleto. Los microtúbulos son necesarios para que ocurra la división celular y la formación y migración de los pronúcleos. Además, se sabe que el espermatozoide incorpora su centriolo dentro del ovocito y pasa a constituir el centrosoma del cigoto. Así que la herencia del centrosoma se produce a través de la línea paterna. En ratón, a diferencia del resto de especies, los centriolos maternos son los que se encargan de la organización microtubular (Schatten, 1994).

La unión de los PN masculino y femenino se considera el final del proceso de fecundación y el principio del desarrollo embrionario (Yanagimachi, 1988). En los mamíferos este proceso dura aproximadamente 12 horas.

1.2.2 FECUNDACIÓN IN VITRO

La fecundación *in vitro* (FIV) ha sido definida como la penetración de espermatozoides capacitados en ovocitos maduros fuera del tracto genital femenino. Sin embargo, esta definición clásica ha sido hoy en día modificada con el desarrollo de la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), que se considera una variante de la FIV tradicional.

Al igual que en la MIV, existen también referencias en cuanto a los medios utilizados para la FIV. Se han estado empleando: el TCM-199 (*Tissue Culture Medium*; Yoshida *et al.*, 1990; Coy *et al.*, 1999), el medio BO (*Brackett and Oliphant Medium*; Wang *et al.*, 1995; Nagai *et al.*, 1988), la solución KRBm (Krebs Ringer Bicarbonato modificada; Naito *et al.*, 1988), el medio TBM modificado (*Tris Buffered Medium*; Abeydeera y Day, 1997) y el medio TALP modificado (*Tyrode-Albumin-Lactate-Piruvate Medium*; Coy *et al.*, 2002; Rath *et al.*, 1999). Es difícil establecer comparaciones entre los diversos medios, pues los protocolos utilizados por los diferentes autores no son exactamente iguales. Además, las variaciones en la composición de los medios y suplementos afectan a más de un componente, por lo que las diferencias no pueden atribuirse a un solo factor.

Otras variables estudiadas en relación a la FIV son la concentración espermática (Coy *et al.*, 1993a; Xu *et al.*, 1996; Martínez, 2002), el tiempo de coincubación espermatozoide-ovocito (Coy *et al.*, 1993b; Martínez, 2002), la procedencia de los espermatozoides (Rath y Niemann, 1997), el volumen del medio de cocultivo (Coy *et al.*, 1993c) y tratamientos de lavado espermático, centrifugación o selección previos a la FIV (Matás *et al.*, 2003).

Uno de los principales problemas que presenta la FIV porcina en la actualidad es la elevada tasa de polispermia, posiblemente debido a que el número de espermatozoides utilizado es demasiado alto en comparación con la fecundación *in vivo* (Hunter, 1999). Uno de los factores a modificar sería la reducción del número de espermatozoides (Coy *et al.*, 1993a) o el uso de adenosina en vez de cafeína en los medios de FIV, ya que esta adenosina promueve la capacitación pero inhibe la reacción acrosómica espontánea (Funahashi y Nagai, 2001; Funahashi y Romar, 2004).

Se ha especulado que parte del problema de la polispermia sea debido a una inadecuada maduración ovocitaria; sin embargo, cuando se utilizan ovocitos recién ovulados y fecundados *in vitro* se obtienen también fecundaciones polispérmicas (Coy *et al.*, 1993a,b,c; Martínez *et al.*, 1996). Además se han obtenido lechones mediante la transferencia de ovocitos MIV a una hembra receptora y posteriormente inseminada (Coy *et al.*, 1999), lo cual también indica que el problema de la polispermia podría ser inherente a la FIV y no a la MIV. En la actualidad, mientras no se consiga identificar el factor o factores que impiden el adecuado establecimiento de la reacción de zona *in vitro* para bloquear la polispermia, la técnica de ICSI se presenta como una alternativa importante en la fecundación *in vitro* en la especie porcina.

1.2.2.1 INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI)

1.2.2.1.1 Concepto y aplicaciones

La Inyección Intracitoplásmica de Espermatozoides (ICSI) es una técnica de fecundación *in vitro* ampliamente usada en los laboratorios de reproducción asistida en la especie humana. La técnica consiste en la introducción de un único espermatozoide en el interior del citoplasma de un ovocito maduro (en estadio de MII) con la ayuda de un micromanipulador, evitando el proceso de unión del espermatozoide a la zona pélucida del ovocito y penetración a través de ésta y de la membrana plasmática. Con esta técnica se pueden obviar acontecimientos que sufren los espermatozoides como la capacitación y la reacción acrosómica, que tienen lugar en el tracto reproductor femenino, la maduración en el epidídimo e incluso la espermiogénesis en el testículo (Yanagimachi, 1997).

El desarrollo de la inyección intracitoplásmica de espermatozoides ha revolucionado el campo de la reproducción asistida en la especie humana y ofrece nuevas perspectivas en el tratamiento de la esterilidad de causa masculina. La ICSI permite conseguir fecundación y gestación incluso en casos extremos en los que se recupera un escaso número de espermatozoides apenas móviles. En la actualidad, sólo aquellos pacientes

con detención en la espermatogénesis no podrían beneficiarse de estas técnicas de microinyección.

Los nacimientos a partir de ICSI hoy en día son frecuentes en la mayoría de los centros de fertilidad humana. Sin embargo, fueron necesarios experimentos iniciales con modelos animales, principalmente ratones, antes de conseguir fecundación mediante ICSI en el hombre. Actualmente, el modelo murino es rechazado por muchos investigadores a causa de sus diferencias específicas con otros mamíferos, ya que el ratón no requiere un centrosoma derivado del espermatozoide para completar la primera división celular (Catt, 1996). De este modo, las especies domésticas tales como la vaca, el caballo o el cerdo, están siendo el foco de atención de los programas de investigación de numerosos laboratorios. La experimentación con animales resultaría útil para comprobar la seguridad de la propia técnica y podría ofrecer grandes ventajas para el entrenamiento de técnicos en ICSI humana (Catt y Rhodes, 1995).

También serían necesarios estudios utilizando modelos animales para determinar las repercusiones genéticas inmediatas, y en sucesivas generaciones, que conlleva el uso de la técnica de la ICSI y otras técnicas de reproducción asistida (Yanagimachi, 1997).

Independientemente de su utilidad en el campo de la reproducción humana, la micromanipulación en ratones y animales domésticos ha sido usada en las dos últimas décadas para el desarrollo y perfeccionamiento de la tecnología de la clonación y la producción de animales transgénicos (Nagashima *et al.*, 2003).

Además de los aspectos clínicos, hay numerosas razones para el estudio de la inyección de espermatozoides en el interior de ovocitos de animales, ya que esta técnica nos permite investigar acerca de aspectos fundamentales del proceso de la fecundación como la interacción con el espermatozoide en el interior del ovocito y aspectos relacionados con el desarrollo embrionario temprano (Rho *et al.*, 1998). Debe haber también aplicación de la ICSI en animales en los que por cualquier razón no es posible la fecundación *in vivo* o *in vitro* por el método clásico (Catt, 1996). Por ejemplo, la ICSI representa un valioso potencial en los programas de recuperación de especies en peligro de extinción, donde el número de gametos disponibles se encuentra bastante limitado (Iritani *et al.*, 1998).

También es de mucha utilidad en la producción de animales de granja de un sexo determinado (Probst y Rath, 2003), en la producción de animales modificados genéticamente, o en la obtención de descendencia a partir de animales de baja capacidad fecundante en FIV o espermatozoides dañados, pero con elevado valor genético.

La ICSI en la especie porcina está experimentando un gran desarrollo como técnica cada vez más necesaria en los procesos de fecundación con espermatozoides procedentes de animales con elevado valor genético o reproductivo. Además, permite reducir la polispermia, uno de los principales problemas de la FIV porcina, ya que sólo un espermatozoide se inyecta en el interior de un ovocito.

Las desventajas de la ICSI incluyen la necesidad de una compleja instrumentación, personal preparado y un efectivo protocolo de trabajo que permita la inyección del espermatozoide en el ovocito en un intervalo menor de 1 minuto para poder obtener un número considerable de ovocitos inyectados.

En cerdos, además de estas dificultades hay que sumar las asociadas al desarrollo embrionario, elevada partenogénesis (Kolbe y Holtz, 1999) y un número muy bajo de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto (Klocke, 1999).

1.2.2.1.2 Antecedentes históricos

La inyección de un espermatozoide en el citoplasma del ovocito no es una innovación reciente. Los primeros estudios en ICSI se realizaron en equinodermos (Hiramoto, 1962) examinando la activación ovocitaria y los eventos post-fecundación. Posteriormente, la técnica fue utilizada en anfibios (Brun, 1974). En cuanto a las primeras inyecciones en mamíferos, éstas se realizaron en hámster (Uehara y Yanagimachi, 1976), donde se observó descondensación de la cabeza espermática, formación de pronúcleo y posterior desarrollo embrionario. Además, se vio que el núcleo espermático es una organela estable, y que los factores citoplasmáticos del ovocito controlan la transformación de ese núcleo en pronúcleo masculino. En 1983, Markert obtuvo fecundación en ratones y demostró la capacidad que tienen los espermatozoides para formar pronúcleos cuando son inyectados en ovocitos de otras especies. En este trabajo también se

observó la capacidad de los ovocitos de ratón de formar blastocistos *in vitro* cuando son inyectados con espermatozoides de su misma especie.

En 1989, Keefer observó en conejos que el método de preparación espermática antes de la ICSI tenía un efecto en la posterior activación y formación pronuclear, observándose una mayor formación de pronúcleos cuando inyectaba espermatozoides capacitados.

Las primeras investigaciones de esta técnica en animales de interés zootécnico (Catt y Rhodes, 1995) demuestran que ovocitos porcinos, ovinos y bovinos pueden dar lugar a formación pronuclear y desarrollo embrionario limitado sin activación exógena mediante la técnica de la ICSI. Además en algunas especies como en ovino, la simple inyección aparentemente era suficiente para activar al ovocito, mientras que en otras la introducción del espermatozoide era lo que producía la activación. En 1996, este mismo equipo de investigación obtuvo porcentajes de fecundación más elevados que en el trabajo anterior y lo atribuyeron a la adición de 25mM Cl_2Ca al medio de preparación de los espermatozoides. Además, obtuvieron por primera vez fecundación con ICSI utilizando semen sexado (O'Brien *et al.*, 1996).

1.2.2.1.3 Aspectos técnicos

Existen diversos aspectos que juegan un importante papel en el éxito de la técnica de inyección de espermatozoides. Por ejemplo, la preparación de las pipetas, tanto la pipeta de sujeción como la de inyección del espermatozoide, que son de crucial importancia. Una buena puesta a punto y un correcto uso del equipamiento facilitan el proceso de inyección. El entrenamiento en el proceso de inyección es de máxima importancia antes de comenzar a realizar ICSI y requiere mucha práctica para obtener la menor variabilidad posible. Además de estos parámetros técnicos, las características del ovocito también juegan su papel y pueden influir en los resultados de la ICSI. Futuros avances en el proceso de inyección y la posible introducción de otras herramientas deberían ayudar a mejorar posibles fallos de la técnica (Joris *et al.*, 1998).

En relación al equipamiento requerido para realizar esta técnica, es necesario un microscopio invertido con dos micromanipuladores y dos

inyectores. La presencia de pipetas adecuadas y la correcta posición de éstas en el microscopio son importantes para la realización de una fácil inyección. El microscopio debe tener x200 ó x400 de magnificación ya que algunos detalles se pierden a magnificación inferior. Además, debe disponer de una placa térmica para poder trabajar a la temperatura deseada (en el caso del cerdo a 38.5 °C). La óptica utilizada también debe facilitar el proceso. Los dos métodos más empleados son el *Direct Interference Contrast* (DIC) y el *Hoffman Modulation Contrast* (HMC). Su elección dependerá de dónde se vaya a realizar la microinyección. DIC se utilizará cuando el material empleado sea de cristal, y HMC cuando vayamos a utilizar material plástico. Por lo general, los micromanipuladores estarán montados en el microscopio, el situado a la derecha del técnico para la pipeta de microinyección y el de la izquierda para la de sujeción; ambos pueden desplazarse en las direcciones de los ejes x-, y-, z-.

Existen una serie de consideraciones a tener en cuenta durante la realización de la técnica, que detallamos a continuación:

⇒ Inmovilización del espermatozoide. La inmovilización puede tener diferentes efectos en el espermatozoide: por un lado, causa daños en la membrana plasmática lo cual permitiría la reacción acrosómica, estimula cambios en el espermatozoide necesarios para inducir la activación ovocitaria y facilita la descondensación y posterior formación del pronúcleo masculino, y por otro lado, previene daños en las estructuras celulares del ovocito por el movimiento activo del flagelo del espermatozoide (Dozortsev *et al.*, 1995b; Kasai *et al.*, 1999). La inmovilización espermática ha sido utilizada para la ICSI en la vaca (Catt y Rhodes, 1995), el caballo (Grondahl *et al.*, 1997), la oveja (Catt y Rhodes, 1995) y el cerdo (Catt y Rhodes, 1995). La inmovilización se realiza mediante un golpe suave en el flagelo espermático con la pipeta de microinyección.

⇒ Aspiración del citoplasma del ovocito. De este modo se provoca la rotura de la membrana citoplasmática y nos aseguramos de que nos encontramos en el interior del ovocito. Algunos estudios demuestran que una vigorosa aspiración, incluso permite unos porcentajes de fecundación mayores que una aspiración suave (Tesarik y Sousa, 1995). Por otra parte, la inyección de un ovocito se puede ver dificultada por las características

propias de éste. La penetración a través de la ZP y la forma de ruptura del oolema puede influenciar el resultado del procedimiento de inyección. No todos los ovocitos responden igual a la microinyección y ofrecen una resistencia variable cuando se pretende atravesar la membrana plasmática. Estas características del ovocito normalmente no pueden evidenciarse mediante una evaluación morfológica, sólo son evidentes durante la realización del proceso. Un porcentaje variable de los ovocitos microinyectados se degeneran como consecuencia de la inyección, debido al daño ocasionado por la pipeta.

⇒ La polivinilpirrolidona (PVP). Se utiliza habitualmente con una concentración final de 5-10% para retardar la motilidad de los espermatozoides y permite un buen control del fluido en el interior de la pipeta, con la intención de facilitar su manejo para la ICSI. Es más difícil controlar el volumen inyectado en el ovocito cuando no se usa PVP aunque se han obtenido resultados similares con o sin su utilización (Hlinka *et al.*, 1998).

⇒ La posición del corpúsculo polar (CP). Para evitar daños en la placa metafásica, el ovocito se inyecta con el CP lo más lejos posible del lugar de inyección, aunque la posición de este CP no siempre es una guía real de la localización de la placa metafásica (Silva *et al.*, 1999). Para la inyección, el CP se sitúa a las 6 ó 12 horarias realizando la inyección a las 3 horarias. Hay estudios que demuestran que aunque no haya diferencias en el porcentaje de supervivencia y fecundación relacionado con la posición del CP, se ha observado que afecta a la calidad embrionaria, resultando embriones con menor grado de fragmentación cuando el corpúsculo se sitúa a las 6 horarias (Nagy *et al.*, 1995).

⇒ Otro importante factor para el éxito de la técnica parece ser el minimizar la exposición de los ovocitos a las condiciones ambientales externas (Kane *et al.*, 2003).

En 2003, Yong *et al.* propusieron un método modificado para la inyección de espermatozoides en el cerdo utilizando pipetas de 3-4µm de diámetro, inferior a la cabeza del espermatozoide porcino, de manera que

esta cabeza queda fuera de la pipeta durante la inyección. Además, utilizaron polivinilalcohol (PVA) en vez de la PVP en el medio de inyección. Al mismo tiempo demostraron similares porcentajes de formación pronuclear, inyectando los espermatozoides con un protocolo diferente al habitual en el que se dispone el espermatozoide en la pipeta a través de la cabeza, a diferencia del protocolo actual que introduce primero la cola.

1.2.2.1.4 Fallos en la activación del ovocito

Existen diversas etiologías asociadas a fallos en la activación del ovocito durante la ICSI. Tesarik y Mendoza en 1999 estudiaron los diferentes patrones de oscilaciones de calcio que se producen durante la fecundación normal y durante la ICSI en la especie humana. Estos autores, observaron que la activación del ovocito en la ICSI sugiere un mecanismo de dos etapas. La primera consiste en un pseudo desencadenamiento (*pseudotrigger*), que tiene lugar durante la inyección, donde se produce una entrada de Ca^{+2} proveniente del medio que rodea al ovocito, siendo este incremento de Ca^{+2} similar al que se produce durante la fusión del espermatozoide al ovocito en condiciones normales. La segunda etapa se caracteriza por el patrón de oscilaciones de Ca^{+2} , resultante de la liberación del factor espermático en el citoplasma del ovocito. No se puede producir una correcta liberación y activación de este factor si la primera etapa no ha producido el incremento de calcio adecuado.

De esta manera, los fallos que se producen en la activación del ovocito pueden explicarse por fallos en la función de pseudodesencadenamiento o por fallos en la función oscilatoria. Los primeros ocurren debido a una entrada insuficiente de Ca^{+2} al interior del ovocito, en medios con baja concentración de calcio, cuando la ICSI se realiza demasiado rápida o cuando no se realiza la aspiración del citoplasma del ovocito que nos permita la ruptura de la membrana plasmática (Tesarik y Mendoza, 1999). Un desencadenamiento insuficiente no permite una función normal del factor espermático que dará lugar a las oscilaciones. Estas oscilaciones son necesarias para completar la segunda división meiótica, descondensación de la cabeza espermática y posterior formación pronuclear. Por otra parte, los fallos debidos a la función oscilatoria son inherentes al espermatozoide o a un retraso en la liberación del factor espermático (por insuficientes tratamientos espermáticos que permitan

alteración de la membrana plasmática del espermatozoide previo a la ICSI). De esta manera se produce un primer incremento en la concentración de calcio (debido al proceso de inyección), pero no se efectúan las correspondientes oscilaciones dando lugar a fallos en la activación o a una incompleta activación del ovocito (Tesarik y Mendoza, 1999).

Los fallos en la activación ovocitaria se reflejan en la persistencia de la MII y la presencia de la cromatina espermática en forma compacta.

1.2.2.1.5 *Uso de agentes activadores*

Para solventar los fallos durante la activación del ovocito, en cerdos, diversos autores han estado utilizando métodos para producir la activación artificialmente, sobre todo con el uso de ovocitos madurados *in vitro*, donde se ha visto la necesidad de esta activación para poder obtener buenos resultados de fecundación y desarrollo embrionario (Di Berardino *et al.*, 2000; Kolbe y Holtz, 2000; Lai *et al.*, 2001; Nakai *et al.*, 2003).

Entre los diferentes tratamientos de activación ovocitaria en la ICSI porcina se han estado utilizando pulsos eléctricos (Kim *et al.*, 1998, 1999), tratamiento de los ovocitos con ionóforo de calcio (Kolbe y Holtz, 1999; Di Berardino *et al.*, 2000), inyección de calcio (Catt *et al.*, 1997) o etanol (Di Berardino *et al.*, 2000).

Kolbe y Holtz (1999) compararon los porcentajes de división mediante el tratamiento de los ovocitos madurados *in vitro* con diferentes concentraciones de ionóforo de calcio (0, 50 y 100 μ M) 5 minutos después de la inyección y observaron que el porcentaje de división estaba relacionado con la concentración de este ión. Di Berardino *et al.* (2000) muestran que si se utilizan ovocitos madurados *in vitro* es necesaria una activación exógena para el desarrollo embrionario y esa activación es mejor con ionóforo de calcio que con etanol. Otros autores sugieren que inyectando calcio conjuntamente con el espermatozoide puede incrementarse el porcentaje de fecundación de un 32% a un 63% (Catt *et al.*, 1997).

Se ha realizado un estudio mediante la inyección de ovocitos madurados *in vitro* a partir de la maduración de folículos preantrales obteniendo unos resultados de 64% de fecundación, 51% de división y un 21% de blastocistos sin necesidad de activación ovocitaria, pero no reportan ningún nacimiento (Wu *et al.*, 2001). Otros autores obtienen resultados similares sin el uso de agentes activadores (Katayama *et al.*, 2002a, 2002b; García-Roselló, 2003).

1.2.2.1.6 Producción de descendencia viva

Se ha obtenido descendencia viva mediante ICSI en diferentes especies. En ratones, Lacham-Kaplan *et al.* lo consiguieron en 1995. En conejos, Hosoi *et al.* (1993) obtuvieron una camada inyectando espermatozoides intactos en el citoplasma de ovocitos madurados *in vivo*. En vacuno, Goto *et al.* (1990) obtuvieron descendencia viva mediante ICSI de espermatozoides muertos. Los ovocitos fueron sometidos a un tratamiento con ionóforo de calcio para inducir la activación. También se ha obtenido descendencia viva en la especie ovina (Catt, 1996), felina (Pope, 1998), y equina (Grondahl *et al.*, 1997).

La obtención de lechones viables mediante esta técnica de fecundación es todavía extremadamente baja y únicamente 4 grupos de investigación han obtenido nacimientos de lechones vivos. Dentro de estos grupos de investigación, sólo uno de ellos utilizó ovocitos madurados *in vitro*. Los primeros lechones obtenidos fueron en el 2000 (Kolbe y Holtz, 2000; Martin, 2000) con ovocitos madurados *in vivo*. Kolbe y Holtz necesitaron de la activación ovocitaria con el ionóforo de calcio, mientras que Martin no utilizó tratamientos exógenos. Estos experimentos demuestran que la activación ovocitaria exógena puede ser opcional en el desarrollo de embriones procedentes de la inyección de ovocitos madurados *in vivo*.

Posteriormente, en 2001, Lai *et al.* obtuvieron el primer lechón (muerto al nacer) procedente de la inyección de ovocitos madurados *in vitro* y para ello fue necesaria la activación mediante pulsos eléctricos, observando que el porcentaje de blastocistos se asemejaba al obtenido con ovocitos madurados *in vivo*. Estos autores concluyen que los ovocitos madurados *in vitro* necesitan activación exógena para el desarrollo

embrionario, proponiendo la activación eléctrica como un medio apropiado para producir estos embriones.

Probst *et al.* en 2002 obtuvieron 13 lechones en dos camadas procedentes de la inyección de espermatozoides sexados y ovocitos madurados *in vivo*, en los que la activación se estimuló mediante la inyección de ClCa_2 .

Recientemente, en 2003, otro grupo de investigación publica el nacimiento de tres lechones mediante la utilización de ovocitos madurados *in vitro* y activados mediante pulsos eléctricos (Nakai *et al.*, 2003).

Son necesarias nuevas investigaciones que abarquen los diferentes aspectos relacionados con la producción *in vitro* de embriones porcinos, dentro de la cual se encuentran la MIV/ICSI/CE y transferencia embrionaria (TE) y establecer las condiciones necesarias para la estandarización del proceso y poder obtener un método que nos permita la producción de un número de embriones viables adecuado y, como consecuencia, un número aceptable de lechones.

1.3 DESARROLLO EMBRIONARIO

1.3.1 DESARROLLO IN VIVO

Después de la etapa de cigoto, los embriones experimentan varias divisiones mitóticas. Durante los primeros estadios de la gestación, las interacciones materno-embriónicas en la especie porcina son de gran importancia debido a que el período preimplantacional es bastante prolongado. Esta interacción queda patente en la sincronía necesaria entre el estadio del embrión y del útero durante la transferencia de embriones.

1.3.1.1 Segmentación o división embrionaria

Como hemos detallado en el apartado anterior, la fecundación tiene lugar en la unión ampular-ístmica del oviducto. Poco después de la fecundación, el cigoto comienza a dividirse a la vez que va recorriendo el

oviducto hacia el útero, esto último facilitado por la acción de los esteroides. Los cigotos sufren la primera división celular aproximadamente a las 17-19h tras la ovulación (Hunter, 1974). Los embriones mantienen el estadio de 2 células durante 6-8h mientras que el estadio de 4 células se prolonga durante 20-24h (Flint, 1981), por lo que la mayoría de 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 las mitosis de las células somáticas.

Durante la permanencia de los cigotos-embryones en el oviducto, éstos se ven influenciados por secreciones propias del oviducto que podrían modificar la composición de la ZP (Hedrick *et al.*, 1987) y además afectar a la tasa de división (Fukui *et al.*, 1988) o a la viabilidad embrionaria (Gandolfi y Moor, 1987).

El oviducto participa activamente en el mantenimiento y preparación de los ovocitos para la fecundación y la división celular posterior. El fluido oviductal (FO), está constituido principalmente por una mezcla de sustancias derivadas del plasma sanguíneo, a través de la trasudación selectiva. El fluido está compuesto por proteínas, enzimas, aminoácidos, compuestos energéticos, hormonas y electrolitos (Romar, 2003) y varía según las fases del ciclo ovárico. Los factores endocrinos son importantes en el desarrollo temprano de los embriones en el oviducto.

Los embriones porcinos en estadio de 4 células se desarrollan en el útero (Stroband y Van der Lende, 1990) y se nutren a partir de las secreciones de la denominada leche uterina, que es producida por influencia de la progesterona. Por otra parte, es posible que los embriones cambien el microambiente uterino al liberar esteroides hacia el útero. Estos esteroides actuarían sobre la permeabilidad vascular local y sobre la liberación de proteínas endometriales. Además, el fluido uterino de los mamíferos parece ser que contiene factores estimulantes e inhibidores de la síntesis de ADN embrionario (Flint, 1981).

El estadio de morula (8-16 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). Durante el proceso de división, las organelas citoplasmáticas son escasas y están concentradas alrededor del núcleo, mientras que las inclusiones de vitelo llenan las zonas periféricas del

citoplasma. Las mitocondrias se elongan en el estadio de mórula, lo que sugiere un incremento en su actividad metabólica. Los nucleolos se observan a partir de estadio de 8 células y éstos se asocian a un incremento en el número de ribosomas.

Todos estos cambios en la síntesis y modificación de proteínas nos indican que se está produciendo la activación del genoma embrionario, el punto a partir del cual el genoma del embrión comienza a ser transcripcionalmente activo y pasa a controlar el desarrollo embrionario (Exley y Carol, 1999). Esta activación varía según las especies; así, en el ratón tiene lugar en estadio de 2 células, mientras que en embriones ovinos tiene lugar en 8-16 células. En cerdos, este inicio en la síntesis de ARN comienza en estadio de 4 células (Freitag *et al.*, 1998). En las etapas anteriores, el desarrollo estaba condicionado por proteínas y ARN maternos, sintetizados y almacenados de forma inactiva por el ovocito (Exley y Carol, 1999). El bloqueo en el estadio de 4 células, uno de los principales obstáculos en el cultivo *in vitro* de embriones, corresponde al momento de la activación del genoma embrionario.

1.3.1.2 Formación del blastocisto

Tan pronto como el embrión llega a 16 células (dependiendo de la especie), las blastómeras empiezan a formar uniones estrechas unas con otras adoptando una forma circular ligeramente lobulada denominada mórula. En este estadio es difícil contar el número de células. Cuando la mórula está formada, las blastómeras 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 "*Tight junctions*", que se producen para modificar las características de permeabilidad. Después de que se hayan formado las uniones estrechas, los fluidos empiezan a acumularse en el interior del embrión. Este acúmulo de fluido se debe a la acción de la bomba de sodio, la cual introduce iones al interior de la mórula; al aumentar la concentración de éstos, el agua difunde hacia el interior y comienza a formarse la cavidad o blastocele en la masa de células. Esta etapa, en la que el embrión aún se encuentra rodeado por la ZP, recibe el nombre de blastocisto y en él 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 (Hafez, 2000). Las células del trofoblasto tienen permeabilidad selectiva, lo cual favorece el transporte de agua y sodio que contribuye a la formación del blastocele.

En el cerdo, las primeras señales de compactación ocurren en el día 4, en el estadio de 8 células (Hunter, 1974). La diferenciación entre las células o blastómeros interiores o exteriores a partir de las 12-16 células en adelante y los primeros complejos de unión aparecen en el estadio de mórula compactada alrededor del día 5 (Barends *et al.*, 1989). El estadio de blastocisto se alcanza en el día 5-6 y el número de células en el momento de formación del blastocele es normalmente de 16-32 (Papaioannou y Ebert, 1988).

1.3.1.3 Eclosión del blastocisto

Antes de la eclosión, los blastocistos sufren un fenómeno de expansión ocupando la totalidad del espacio perivitelino, pasándose a denominar blastocisto expandido. La media de células en los blastocistos porcinos expandidos es de 65-120.

Entre el día 6-7 se produce la rotura de la ZP y la salida del embrión por el punto de rotura. Este proceso parece ser independiente del número de células por blastocisto, al menos en estudios *in vitro* (Niemann *et al.*, 1983). Entre las causas de rotura se encuentran el crecimiento y 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.

Los blastocistos porcinos, en el momento de la eclosión contienen prostaglandina E (Stone *et al.*, 1986) que podría estar implicada en la regulación del transporte del agua colaborando en la rotura de la ZP.

El blastocisto eclosionado, o blastocisto que se ha desprendido de la ZP, comienza una fase de alargamiento y rápido crecimiento, pasando de una forma esférica a una tubular o filamentososa. El diámetro del blastocisto recién eclosionado es de 0.2mm aproximadamente. El momento en el que esto ocurre es variable según las especies y coincide con la migración uterina, o etapa en la que los embriones se mueven en el útero en busca de un lugar adecuado para implantarse. Paralelamente ha tenido lugar la diferenciación de las hojas blastodérmicas (ecto, meso y endodermo) a partir del nódulo embrionario. Tras la eclosión, los blastocistos porcinos permanecen en el útero hasta el día 13 (Dantzer, 1985).

Los embriones porcinos empiezan a adherirse a la superficie uterina el día 13, finalizando la adhesión a través de la superficie trofoblástica entre los días 18 a 24.

1.3.1.4 Reconocimiento maternal de la gestación

En la mayoría de las especies domésticas, tiene que surgir una señal en las etapas tempranas de la gestación para informar que ésta sea mantenida y no se inicie un nuevo ciclo estral. Más específicamente, la concentración de progesterona en la sangre materna tiene que permanecer en niveles elevados, de forma que el endometrio mantenga las condiciones adecuadas que garanticen la supervivencia del embrión.

En el cerdo, la producción de estrógenos por el embrión en desarrollo es la señal para el reconocimiento materno de la gestación (Geisert *et al.*, 1990). Períodos de producción de estrógenos entre los días 11 y 12 y los días 14 al 30 de gestación permiten el mantenimiento del cuerpo lúteo.

El mantenimiento de la gestación en el cerdo es dependiente de un mínimo de ocupación fetal en el útero. Son críticos aproximadamente los días 11 y 12 de gestación, cuando los estrógenos derivados del embrión son los responsables del reconocimiento maternal de la gestación (Geisert *et al.*, 1990). Durante este período, son necesarios como mínimo de 4 a 5 embriones viables (Polge *et al.*, 1996) o al menos un 50% de ocupación uterina (Geisert *et al.*, 1990) para el mantenimiento de la gestación. Este requerimiento termina alrededor del día 14, a partir del cual el número de

embriones necesarios es menos crítico (Dzuik, 1985). De esta manera, un número inferior a 4 embriones es incapaz de sobrepasar completamente la influencia luteolítica normalmente ejercida por un útero no gestante.

1.3.2 CULTIVO DE EMBRIONES (CE) IN VITRO

1.3.2.1 Problemática actual en la especie porcina

El limitado desarrollo de los embriones hasta estadio de blastocisto y su menor calidad en comparación a los obtenidos *in vivo*, no se debe a un fallo puntual en el sistema de producción *in vitro* de embriones, sino a una combinación de determinados factores como una inadecuada o incompleta maduración citoplasmática, una inadecuada formulación de los medios de cultivo y unas condiciones de cultivo subóptimas. En los sistemas de FIV porcina, además de los factores mencionados anteriormente, se suma la polispermia. Con la ICSI, este fallo se minimiza, y sin embargo los cigotos resultantes de esta técnica dan lugar a un número muy bajo de blastocistos (Klocke, 1999). Se conocen posibles etiologías asociadas a este bajo desarrollo embrionario. Entre éstas podemos destacar las siguientes:

⇒ Fallos en el medio de cultivo de embriones. Varios trabajos realizados con la técnica de la ICSI muestran también baja capacidad de formación de blastocistos, tanto en ovocitos madurados *in vivo* (Martin, 2000) como en ovocitos madurados *in vitro* (Klocke, 1999; Kolbe y Holtz, 1999; Probst y Rath, 2003), indicando la posibilidad de fallos en el medio y condiciones de cultivo de embriones.

⇒ Fallos durante el proceso de maduración *in vitro*. Aunque los ovocitos son capaces de completar la meiosis *in vitro*, solo un porcentaje pequeño son capaces de continuar su desarrollo hasta blastocisto. Según algunos autores esto podría indicar que el proceso de maduración *in vitro* (MIV) no es del todo normal (Klocke, 1999; Probst y Rath, 2003). Diversos estudios comparan el uso de ovocitos madurados *in vivo* frente a los madurados *in vitro* durante la realización de la ICSI, obteniéndose mejores resultados con los primeros (Kolbe y Holtz, 1999; Probst y Rath, 2003). De

igual manera se han obtenido mayor número de lechones mediante esta tecnología y el uso de ovocitos madurados *in vivo* (Probst y Rath, 2003).

⇒ Fallos en la activación ovocitaria. Aunque los ovocitos se activen y sean capaces de formar pronúcleos, puede haber deficiencias en este sistema de activación. Diversos estudios han demostrado una necesidad de activación exógena para que el ovocito inyectado sea capaz de continuar su desarrollo embrionario (revisado en el apartado de activación).

1.3.2.2 Condiciones de cultivo

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

La relación **embriones/volumen** de medio también ha sido objeto de estudio. En la actualidad, los embriones se cultivan en excesivos volúmenes de medio de cultivo a pesar de que en condiciones *in vivo* se observan cantidades únicamente de 1.5-2.0nl (y en el oviducto probablemente cantidades de picolitros). Una de las hipótesis propuestas para el efecto beneficioso del cultivo en grupo y/o en un pequeño volumen de medio es la producción de factores autocrinos y/o paracrinos por parte del embrión en el cultivo (O'Neill, 1998), que estimularían el desarrollo del propio embrión que los genera y el de los embriones vecinos. De esta manera, el cultivo en volúmenes grandes daría lugar a la dilución de estos factores, de tal modo que la concentración no sería la adecuada para ejercer el efecto (Gardner, 1994). Entre estos posibles factores se han descrito los siguientes: factores de crecimiento con propiedades mitogénicas o de diferenciación PDGF (*Platelet-derived Growth Factor*; Thibordeaux *et al.*, 1995), factores anti-apoptóticos o de supervivencia, como el TGFβ (*Transforming Growth factorβ*; Brison y Schultz, 1997) y el PAF (*Platelet-activating factor*; O'Neill, 1998), los cuales actuarían reduciendo los niveles de apoptosis dentro de la masa celular interna.

1.3.2.3 Medios de cultivo y suplementos

Los embriones de los mamíferos (como el ganado vacuno, ovino y porcino) difieren radicalmente en el grado de crecimiento preimplantatorio de otros animales como ratones y otras especies de laboratorio. El embrión de 1 célula de ratón contiene aproximadamente 20ng de proteínas al igual que en el estadio de blastocisto preimplantatorio (Kane, 2003); por lo tanto, la fase de crecimiento anterior al estadio implantatorio es mínima o prácticamente inexistente. Sin embargo, el embrión de vaca, al igual que el de cerdo, presenta alrededor de 132ng de proteínas en estadio de 2 células, alcanzando unos niveles de 185ng en el día 8 y de 900ng en el día 16 (Kane, 2003). Estas diferencias en el grado de crecimiento preimplantatorio repercuten en el cultivo de embriones. Por este motivo, es más fácil cultivar embriones de ratón durante un período de 3-4 días desde estadio de 1 célula hasta blastocisto en un medio simple sin presencia de aminoácidos, vitaminas o elementos traza; por el contrario, es más difícil obtener buenos blastocistos en animales de granja mediante tecnologías *in vitro*.

El contraste entre el limitado crecimiento y el pequeño incremento en el contenido de proteínas hasta estadio de blastocisto en vacas, ovejas y cerdos, y el gran incremento en crecimiento y contenido protéico después de la eclosión del blastocisto, nos indican los diferentes problemas de cultivo asociados al crecimiento temprano y al estadio de blastocisto.

Los primeros estudios de cultivo de embriones a partir de ovocitos madurados *in vivo* en la especie porcina, realizados por Davis en 1985, observaron un bloqueo en el estadio de 4 células. Este bloqueo coincide con la activación del genoma embrionario y es la etapa en la que el embrión pasa del oviducto al útero.

El cultivo *in vitro* de embriones porcinos ha experimentado avances considerables en los últimos años. Desde la extensa revisión llevada a cabo por Peters y Wells en 1993, las mejoras en los sistemas de cultivo podrían resumirse en tres aspectos. En primer lugar, el medio NCSU (Peters y Wells, 1993) es el medio más comúnmente empleado en los sistemas de cultivo de embriones, ya que es el medio con el que mayor porcentaje de blastocistos se ha obtenido (Machaty *et al.*, 1998). Lo que aún no se ha clarificado fehacientemente es la diferencia entre el uso del NCSU23 (Abeydeera *et al.*, 1998; Machaty *et al.*, 1998) y el NCSU37 (Hajdu *et al.*, 1994; Kikuchi *et al.*,

1999). Es necesario establecer si la taurina e hipotaurina del NCSU23 podría ser reemplazada por el sorbitol del NCSU37, o quizá sería mejor el uso de un medio con los tres suplementos. Estos componentes están asociados a diferentes aspectos fisiológicos y podrían tener efectos sinérgicos cuando se usan de manera conjunta. La taurina e hipotaurina actúan como osmorreguladores y estabilizadores del pH. Además, se ha descrito que la adición de taurina al medio incrementa el desarrollo embrionario (Peters y Wells, 1993) posiblemente debido a un efecto protector contra los daños peroxidativos (Guerin *et al.*, 1995). Por otra parte, el sorbitol, se sabe que en ratón presenta un efecto beneficioso en la compactación en estadio de mórula y expansión del blastocisto (Wells *et al.*, 1992).

Otra de las mejoras interesantes se basa en el efecto de la adición de suero a partir del día 5. Koo *et al.* en 1997 demostraron la necesidad de añadir suero en los estadios de mórula al medio NCSU para que produjera la eclosión del blastocisto. A pesar de que muchos grupos de investigación promueven el uso de medios químicamente definidos necesarios para una correcta estandarización entre los diferentes laboratorios (Iwasaki *et al.*, 1999), el suero fetal bovino (FCS: *Foetal Calf Serum*) inactivado a 56°C durante 30 minutos está siendo ampliamente utilizado como fuente proteica y de factores de crecimiento en los medios de CE. Debido al efecto bifásico de este suero, el desarrollo temprano es inhibido mientras que estimula la compactación de la mórula y la expansión del blastocisto (Lim *et al.*, 1994), por lo que debería ser añadido únicamente en el 5º día de cultivo. La concentración de FCS utilizado en la especie porcina varía entre laboratorios desde un 10% (Dobrinsky *et al.*, 1996) hasta un 20% (Koo *et al.*, 1997).

En tercer lugar, se podría utilizar cocultivos con células oviductales y endometriales para intentar mimetizar el cultivo *in vivo*, y de esta manera, proporcionar sustancias esenciales producidas por estas células. Estas sustancias no se incluyen en los medios químicamente definidos, debido a la falta de información sobre ellas (Rath *et al.*, 1995). En cerdos, se ha visto incrementada la monospermia mediante el uso de células oviductales (Nagai y Moor 1990; Romar *et al.*, 2001), incluso se han utilizado en la especie bovina dando buenos resultados (Katska *et al.*, 1998). Al mismo tiempo, se han realizado diversos estudios mediante el uso de células endometriales en la especie humana (Katsuragawa *et al.*, 1995), y en ratones (Soong *et al.*, 1998) donde se ha visto un incremento en el desarrollo embrionario. En la especie porcina, como ya hemos revisado en el apartado anterior, el cigoto

entra en el útero en el estadio de 2-4 células; esto significa que durante el desarrollo temprano, el embrión contacta en primer lugar con las células oviductales y posteriormente con las endometriales. Mediante el intento de mimetizar en lo máximo posible estas condiciones que se dan *in vivo*, se podría incrementar el número y calidad de blastocistos (Niemann y Rath, 2001).

Otro punto de estudio sería el uso de oviductinas. Las oviductinas son glicoproteínas sintetizadas en las células oviductales, que se unen a la ZP después de la ovulación (Kane, 2003). Es sabido que su función es cambiar las propiedades de la zona, dándole protección al embrión y posiblemente pueda afectar a su desarrollo posterior.

En relación al medio de cultivo post-inyección de los ovocitos porcinos, se están empleando comúnmente dos medios; por una parte el NCSU-23 (Kim *et al.*, 1998; Kolbe y Holtz., 1999; Lai *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1998, 2003) un medio típico de cultivo de embriones, mientras que otro grupo de investigación (Probst y Rath, 2003) utiliza un medio tradicional de FIV para las primeras 20h de cultivo y posterior transferencia a medio de CE. La diferencia entre ambos medios radica principalmente en la cantidad de calcio disponible.

El medio TALP formulado según describen Rath *et al.* (1999), al ser un medio de FIV, posee mayores cantidades de calcio (8mM en forma de lactato cálcico) que el NCSU-23 (1.70mM en forma de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), que además presenta en su composición taurina e hipotaurina. Se sabe que el calcio es un ion imprescindible en el proceso de activación ovocitaria y durante este proceso se van llenando los depósitos intracelulares mediante una captación de calcio extracelular. Además, en la composición de este medio se incluyen el piruvato (0.12mg/ml) y el lactato sódico (10mM). El piruvato y el lactato son dos fuentes de energía necesarias para los primeros estadios de desarrollo *in vitro* en la especie porcina (Kikuchi *et al.*, 2002). Se ha demostrado asimismo, que el piruvato es necesario para la respiración mitocondrial y la división celular durante el desarrollo preimplantacional en humanos (Wilding *et al.*, 2002). Además, el piruvato presenta capacidad antioxidante actuando como protector contra la citotoxicidad inducida por los peróxidos orgánicos en cultivos celulares renales y neuronales (Desagher *et al.*, 1997; Nath *et al.*, 1994). El lactato,

por su parte, incrementa el metabolismo del piruvato en embriones de ratón (Lane y Gardner, 2000).

Queda por dilucidar si una secuencia en el uso de medios de cultivo (primero uno específico de FIV, seguido de otro de CE) podría mejorar los resultados actuales de desarrollo embrionario *in vitro*.

1.3.2.4 Morfología y calidad de los embriones

Existen fallos durante el cultivo *in vitro* de los embriones que originan defectos en el sistema microtubular del ovocito. Se han llevado a cabo estudios comparativos de distribución de los filamentos de actina (responsable del mantenimiento de la placa metafásica, rotación de los cromosomas, liberación del corpúsculo polar, migración pronuclear y desarrollo de la mitosis celular), en embriones producidos *in vitro* mediante FIV e *in vivo*, donde se observaron diferentes patrones de distribución de estos filamentos intracelulares. Además, se vio fragmentación, presencia de blastómeras binucleadas y un menor número de células por blastocistos, en los embriones producidos *in vitro* a diferencia de los producidos *in vivo* (Wang *et al.*, 1999). Estos resultados demuestran que la baja capacidad de desarrollo de los embriones producidos *in vitro* parcialmente es debida a las subóptimas condiciones de cultivo.

1.3.2.5 Valoración de la capacidad de desarrollo embrionario

En relación a la valoración de los resultados anterior al desarrollo embrionario, ésta se realiza sobre las 18-20h después de la ICSI, cuando ya se ha alcanzado el estadio de desarrollo pronuclear. Los ovocitos con al menos un pronúcleo se consideran activados. Estadios con dos pronúcleos se clasifican como fecundados en los grupos inyectados con espermatozoide y partenogénéticos en los grupos inyectados sin espermatozoide (García *et al.*, 2003).

A las 48h de la ICSI se valora el número de divisiones celulares aunque no es un parámetro muy exacto debido a la gran inestabilidad de los ovocitos porcinos y a la tendencia a dividirse mediante fragmentación (Kolbe y Holtz, 1999). Resulta difícil distinguir sólo con criterios

morfológicos un embrión dividido correctamente y otro fragmentado o dividido partenogénicamente.

El parámetro más valorado en la capacidad de desarrollo embrionario en la mayoría de los laboratorios es el número de blastocistos obtenidos, así como el número de células por blastocisto, ya que se considera como un parámetro de calidad embrionaria.

Sin embargo, hemos revisado en este apartado, que el sistema de CE ocasiona alteraciones en el embrión. Por lo tanto, la prueba definitiva que va a medir la viabilidad embrionaria es el establecimiento de gestaciones y el nacimiento de crías vivas tras la transferencia a una hembra receptora. No obstante, tiene el inconveniente de ser una técnica de coste elevado por lo que no se realiza de manera rutinaria. Actualmente, el éxito alcanzado en las transferencias es muy variable y, como mucho, sólo el 20 ó 30% de los embriones sobrevive tras la transferencia (Abeydeera *et al.*, 2002), cuando los embriones proceden de FIV. En el caso de la ICSI, los porcentajes son muy inferiores (revisado en el apartado de ICSI).

1.3.2.6 Transferencia de embriones

En el cerdo, desde hace varias décadas se ha estado realizando la transferencia de embriones por vía quirúrgica. Sin embargo, en el campo relacionado con las aplicaciones comerciales sólo se ha utilizado de manera limitada debido a la necesidad de equipamiento, instalaciones adecuadas y anestesia. El éxito de la aplicación en la especie bovina de la recogida no quirúrgica de embriones y de la transferencia y técnicas relacionadas, ha estimulado el desarrollo de sistemas semejantes en el cerdo.

Hasta el momento, se han utilizado tres tipos de técnicas: 1) la transferencia quirúrgica clásica mediante laparotomía e introducción de los embriones en el oviducto o en el extremo del cuerno uterino dependiendo del estado de desarrollo, con porcentajes de gestación entre el 17 y el 100% y tamaños de camada entre 2.4 y 10.8 lechones (Cameron *et al.*, 1990); 2) la técnica de laparoscopia, con porcentajes de éxito que van del 14 al 90% y tamaños de camada de 7 a 9 lechones (Besenfelder *et al.*, 1998) y 3) los procedimientos no quirúrgicos, basados en el abordaje

transcervical y la introducción de los embriones en el útero a través de sondas especiales, que tienen la ventaja de no precisar sedación en los animales, no ser invasivos y ser repetibles indefinidamente en el mismo animal. Los porcentajes de gestación en este caso varían del 9 al 64% y el tamaño de las camadas de 3.1 a 10.9 lechones (Yonemura *et al.*, 1996; Hazeleger *et al.*, 2000). Recientemente se ha desarrollado una nueva sonda para transferencia embrionaria tanto en hembras nulíparas como en multíparas, que permite la introducción de los embriones por vía intrauterina profunda. Se ha obtenido también descendencia mediante esta sonda (Martínez *et al.*, 2004) con unos porcentajes de gestación (70%) similares a los obtenidos por transferencia quirúrgica y una media de 7 lechones por cerda.

La edad del embrión es un dato muy importante a la hora de realizar las transferencias; dependiendo del estadio en que se encuentre se dispondrán en oviducto o útero mimetizando las condiciones *in vivo*. Los mayores éxitos se han conseguido con la transferencia de embriones de 2-4 células en el oviducto o de blastocistos en el cuerno uterino y, mientras que en el primer caso, no es posible el abordaje transcervical, en el segundo sí es posible.

Otros factores a tener en cuenta son las condiciones higiénicas. El uso de antibióticos y material estéril para prevenir contaminaciones aporta mayor probabilidad de éxito al procedimiento (Yonemura *et al.*, 1996). En cuanto a la edad de las hembras, normalmente se utilizan hembras primíparas porque son más fáciles de manejar y toleran mejor la anestesia y los procedimientos quirúrgicos que las cerdas adultas. Por último, la sincronización o la misma procedencia de los embriones; los obtenidos por FIV o por ICSI no presentan la misma calidad inicial que los obtenidos *in vivo* como hemos explicado anteriormente.

Por otra parte, en la producción de descendencia viva juega un papel clave el reconocimiento y mantenimiento de la gestación. Al menos dos técnicas se están empleando para ayudar en el reconocimiento y mantenimiento de la gestación tras la transferencia de embriones cultivados *in vitro*. La primera es la administración exógena de estrógenos, los cuales actúan alterando la liberación de prostaglandinas del útero (Frank *et al.*, 1977). Estos estrógenos pueden administrarse a intervalos entre aproximadamente los días 11 y 15 de gestación (Geisert *et al.*, 1990). La

segunda técnica consiste en la inducción de cuerpos lúteos mediante la administración de eCG y hCG en el día 9 y el día 12 de gestación respectivamente (Ellicot *et al.*, 1973). Esta segunda población de cuerpos lúteos es refractaria a los efectos luteolíticos de la prostaglandina liberada alrededor del día 14 del ciclo estral original y proporciona una fuente continua de progesterona capaz de mantener la gestación (Bazer *et al.*, 1982).

_____ **OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**

2

OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Tras el análisis del estado actual de conocimientos realizado en el apartado anterior, nos planteamos como **objetivo general** en esta Tesis Doctoral contribuir de algún modo a **aumentar el rendimiento actual de la técnica de ICSI en la especie porcina**, abordando para ello parte de las distintas etiologías que se señalan como posibles causantes del bajo desarrollo embrionario (página 49 de la revisión bibliográfica).

Las etiologías que se han propuesto nos sirvieron para el planteamiento de **nuestras tres hipótesis** de trabajo:

1. Optimizando la secuencia de utilización de los medios de fecundación *in vitro* y de cultivo de embriones (FIV y CE) se puede mejorar el rendimiento de la técnica de ICSI en la especie porcina.
2. Mejorando el sistema de maduración *in vitro* del ovocito se puede aumentar el rendimiento de la técnica de la ICSI en la especie porcina.
3. Mediante la inyección InsP_3 junto con el espermatozoide se puede mejorar la activación ovocitaria, y con ello, el porcentaje final de blastocistos que se obtienen tras la ICSI en la especie porcina.

Para la aceptación o rechazo de cada una de las hipótesis fue necesario el planteamiento de una serie de objetivos específicos:

1. Optimizando la secuencia de utilización de los medios de fecundación *in vitro* y de cultivo de embriones (FIV y CE) se puede mejorar el rendimiento de la técnica de ICSI en la especie porcina.

La mayoría de los investigadores transfieren los ovocitos recién inyectados a un medio de cultivo de embriones como es el NCSU-23 (revisado en página 56). Sin embargo, en condiciones *in vivo*, el cigoto recién fecundado se encuentra en el ambiente oviductal, muy diferente del ambiente uterino al que se desplaza con posterioridad (48 horas post-ovulación, estadio de 2-4 células). Por lo tanto, el desarrollo embrionario *in vitro* podría mejorar si los ovocitos recién inyectados se transfieren a un medio con las características de los medios de FIV (TALP), en los cuales tiene lugar la penetración del espermatozoide y el desarrollo pronuclear, como ocurre en el oviducto, y posteriormente a un medio de cultivo de embriones (NCSU-23), capaz de aportar los nutrientes necesarios para soportar las primeras divisiones celulares, como ocurre en el útero. Sería importante, además, determinar el periodo de tiempo óptimo de permanencia de los ovocitos inyectados en el medio de FIV, ya que al eliminar etapas como la unión espermatozoide-zona pelúcida, el paso a través de ésta, la unión del gameto masculino a la membrana plasmática del ovocito, la fusión y posterior penetración espermática, es posible que el tiempo necesario para la formación de los pronúcleos se acortara con respecto al observado *in vivo* o mediante FIV convencional. En consecuencia, el primer objetivo específico de esta Tesis consistió en comprobar si el rendimiento de la técnica de ICSI mejora cuando los ovocitos son cultivados durante las primeras horas post-inyección (6h ó 20h) en un medio de FIV y posteriormente son transferidos a un medio de CE con respecto a un grupo control que directamente se transfiere al medio de CE. Los grupos de trabajo que elegimos para conseguir este objetivo se detallan en el apartado de diseño experimental.

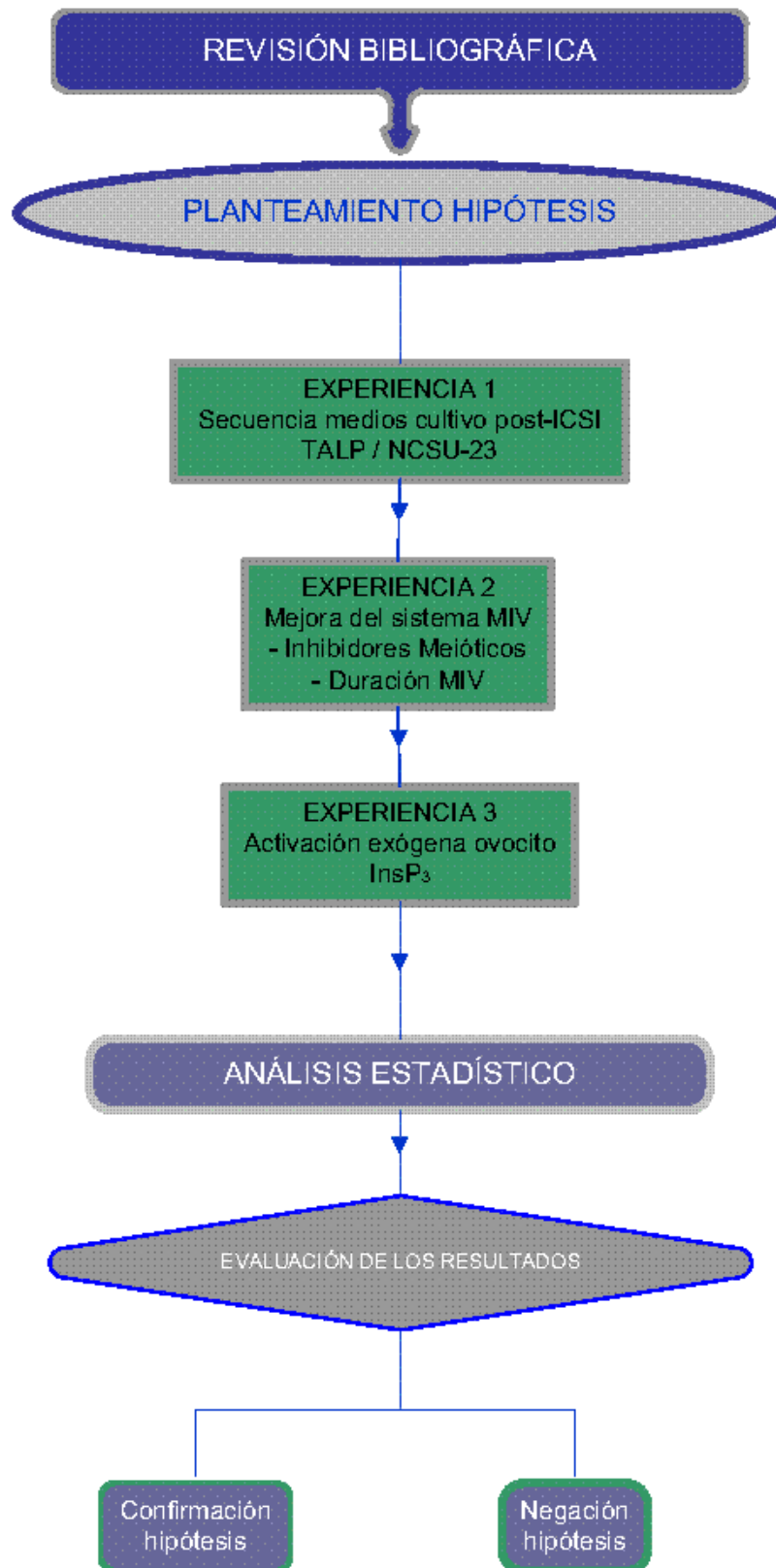
2. Mejorando el sistema de maduración *in vitro* del ovocito se puede aumentar el rendimiento de la técnica de la ICSI en la especie porcina.

Durante la maduración *in vitro*, ovocitos que fisiológicamente no están destinados a ser ovulados en un periodo de tiempo inferior a 44 horas, son extraídos de sus folículos y cultivados hasta que alcanzan el

estadio de MII, indicador de la maduración nuclear. Sin embargo, se les priva de una importante etapa de diferenciación y maduración citoplasmática durante la cual, en el interior del folículo, adquieren la competencia para el posterior desarrollo embrionario temprano. Numerosos autores han planteado la hipótesis de que con el uso de inhibidores meióticos es posible cultivar ovocitos detenidos en estadio de GV durante un tiempo limitado, y posteriormente someterlos a maduración *in vitro*, permitiendo de este modo que la maduración citoplasmática y la capacidad de desarrollo embrionario mejoren (revisado en páginas 26-27). Nuestro **segundo objetivo específico** consistió en estudiar el efecto del precultivo en roscovitina, un inhibidor meiótico, sobre los resultados de la ICSI en la especie porcina, analizando para ello diversos indicadores de maduración nuclear, maduración citoplasmática, fecundación y desarrollo embrionario de los ovocitos precultivados en presencia de roscovitina. Además, dentro de esta misma hipótesis, nos planteamos un **tercer objetivo específico** para averiguar si el precultivo en roscovitina afectaba al tiempo requerido para la posterior reanudación de la meiosis *in vitro* y, consecuentemente, a la capacidad de desarrollo embrionario temprano.

3. Mediante la inyección InsP_3 junto con el espermatozoide se puede mejorar la activación ovocitaria, y con ello, el porcentaje final de blastocistos que se obtienen tras la ICSI en la especie porcina.

Numerosos autores han empleado diversos agentes para imitar *in vitro* las oscilaciones de Ca^{+2} responsables de la activación del ovocito. Debido a que los embriones obtenidos mediante ICSI en la especie porcina cesan muy tempranamente en sus divisiones y no alcanzan el estadio de blastocisto, se supone que la inyección del espermatozoide por sí sola representa un estímulo insuficiente para que el ovocito comience y continúe la secuencia de acontecimientos que supone el proceso de activación, hasta llegar al estadio de blastocisto. Por esta razón, nuestro **cuarto objetivo específico** consistió en comprobar si la inyección de InsP_3 junto al espermatozoide estimulaba el proceso de activación ovocitaria mejorando el porcentaje final de blastocistos obtenido.



MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MEDIOS DE LAVADO Y MANIPULACIÓN GAMETOS

3.1.1 Transporte y lavado de ovarios

3.1.2 Dilución y lavado espermatozoides

3.2 MEDIOS DE CULTIVO Y SUPLEMENTOS

3.3 MADURACIÓN IN VITRO (MIV)

3.4 VALORACIÓN DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE GSH

3.5 PROCESADO DE LOS ESPERMATOZOIDES

3.6 INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI)

3.7 CULTIVO DE EMBRIONES

3.8 VALORACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS RESULTADOS

3.8.1 Valoración del estadio nuclear

3.8.2 Valoración de la formación pronuclear

3.8.2 Valoración del desarrollo embrionario

3.9 TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

3.9.1 Transporte de los cigotos

3.9.2 Anestesia

3.9.3 Apertura de la cavidad abdominal

3.9.4 Cierre de la cavidad abdominal

3.9.5 Diagnóstico de gestación

3.10 DISEÑO EXPERIMENTAL

3.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

MATERIAL Y MÉTODOS

En este apartado se describirá la metodología seguida en el presente trabajo refiriendo simultáneamente el material utilizado. Salvo que se indique lo contrario todos los reactivos empleados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Madrid, España).

3.1 MEDIOS DE LAVADO Y MANIPULACIÓN DE GAMETOS

3.1.1 TRANSPORTE Y LAVADO DE OVARIOS Y OVOCITOS.

Los medios utilizados para el transporte y lavado de los ovarios, así como para la obtención de los ovocitos fueron los siguientes:

- **Solución Salina** (SS): 0.9% w/v de NaCl con 100 mg/l de sulfato de kanamicina.

- **Solución de cetrimida** (Bromuro de hexadecil-trimetilamonio: Cetab) al 0.04% (w/v).

Ambas soluciones fueron preparadas con agua purificada (Mili-RX) y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su uso en el lavado y recogida de ovarios.

- **Tampón Fosfato Salino de Dulbecco modificado (PBS)** suplementado con 1mg/ml de alcohol polivinílico y 0.005mg/l de rojo fenol como indicador de pH. Este medio se conservó a 4°C hasta su utilización en la manipulación y lavado de los ovocitos recién recolectados.

El medio utilizado para el lavado de los ovocitos maduros, y durante la inyección fue **PBS suplementado** con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FCS; Biological Industries®, Haemek, Israel).

3.1.2 DILUCIÓN Y LAVADO DE ESPERMATOZOIDES.

El medio utilizado para la dilución y lavado de los espermatozoides fue el *Beltsville Thawing Solution* (BTS) (tabla 1):

Tabla 1. Diluyente BTS para espermatozoides de verraco (Pursel y Johnson, 1975).

Componente	Concentración (mM)
Glucosa	0.0002
Na ₂ .EDTA•2H ₂ O	3.36
CO ₃ HNa	15
Citrato-Na ₃ •2H ₂ O	20
CIK	5

En la preparación de los espermatozoides para la ICSI, el medio utilizado fue el PBS suplementado.

3.2 MEDIOS DE CULTIVO Y SUPLEMENTOS

Los medios para la maduración *in vitro* de ovocitos (MIV), cultivo posterior a ICSI y cultivo *in vitro* de embriones (CE) se detallan a continuación:

Medio **NCSU-37 stock** . Se preparó en el laboratorio una solución stock (tabla 2) con agua ultrapura (Milli-Q). A continuación, se esterilizó por filtración haciéndolo pasar a través de un filtro de membrana con diámetro

de 0.22 μm y se conservó en condiciones estériles a 4°C durante un máximo de dos semanas.

Para MIV, el medio NCSU-37 stock se suplementó con cisteína, β -mercaptoetanol, insulina, dibutiril AMP cíclico (dbAMPc), fluido folicular porcino (PFF), PMSG y HCG (Foligón®, Chorulón®; Intervet International B.V., Boxmeer, Holanda) tal y como describen Funahashi *et al.* (1997a) y como se refleja en la tabla 3.

Tabla 2. Composición del medio NCSU-37 stock (Peters y Wells, 1993).

Componente	Concentración (mM)
NaCl	108.73
NaHCO₃	25.07
KCl	4.78
KH₂PO₄	1.19
MgSO₄·7H₂O	1.19
CaCl₂·2H₂O	1.70
Glucosa	5.55
D-Sorbitol	12.00
Penicilina G sódica	0.18
Sulfato de estreptomicina	39.00 UI/ml

Tabla 3. Suplementos del medio NCSU-37 para maduración *in vitro* de ovocitos porcinos (Funahashi *et al.*, 1997a).

Componente	Concentración
Cisteína	0.57 mM
β-mercaptoetanol	50.00 μM
Insulina	5.00 mg/l
dbAMPc	1.00 mM
PFF	10% (v/v)
PMSG	10 UI/ml
HCG	10 UI/ml

Medio TALP. La solución stock (tabla 4) fue elaborada en el laboratorio con agua ultrapura. A continuación, se esterilizó mediante filtración y se conservó bajo condiciones estériles a 4°C durante un máximo de dos semanas.

Tabla 4. Composición del medio TALP stock (Rath *et al.*, 1999).

Componente	Concentración (mM)
NaCl	114.06
NaHCO₃	25.07
KCl	3.20
NaH₂PO₄·H₂O	0.35
MgCl₂·6H₂O	0.50
Lactato Ca·5H₂O	8.00
Lactato sódico	10.00
Glucosa	5.00
Cafeína	2.00
Sulfato de kanamicina	0.17
Rojo fenol	0.003
PVA	1 mg/ml

Para el cultivo posterior a la ICSI, el medio TALP stock se suplementó con 3 mg/ml de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (BSA-FAF) y 0.12 mg/ml de piruvato sódico, tal y como describen Rath *et al.* (1999). El pH se ajustó hasta 7.4 en un incubador al 5% de CO₂, 38.5°C y atmósfera saturada de humedad durante 20h antes de su uso.

Medio NCSU-23. Siguiendo el protocolo de Peters y Wells (1993), se elaboró una solución stock (tabla 5) con agua ultrapura, se esterilizó por filtración y se conservó a 4°C durante un máximo de dos semanas. En el momento de su uso para CE, el NCSU-23 stock se suplementó con 4 mg/ml de BSA-FAF, insulina 0.57mM, β-mercaptoetanol 50μM, 2% (v/v) de BME

(aminoacids solution 50x) y 1% (v/v) de MEM (*non-essential amino acid solution* 100x). Se filtró y se introdujo en el incubador un día antes de su uso.

Mientras no se especifique lo contrario, cuando se haga referencia a un medio de cultivo se entenderá como finalmente suplementado para ICSI o CE.

Tabla 5. Composición del medio NCSU-23 stock (Peters y Wells, 1993).

Componente	Concentración (mM)
NaCl	108.73
NaHCO₃	25.07
KCl	4.78
KH₂PO₄	1.19
MgSO₄·7H₂O	1.19
CaCl₂·2H₂O	1.70
Glucosa	5.55
Taurina	7.00
Hipotaurina	5.00
Penicilina G sódica	0.18
Sulfato de estreptomicina	39 UI/ml

Preparación de la **Roscovitina**. A partir de la muestra comercial del R- enantiómero de roscovitina (2-[R]- [1-Etil-2-hidroxietilamino] -6-benzilamino-9-isopropilpurina) se procedió a su dilución en dimetilsulfóxido (DMSO) en concentración stock 10mM. Posteriormente, esta solución se congeló a -20° C hasta su uso.

Preparación del **Inositol 1, 4, 5-trifosfato** (InsP₃). El InsP₃ se diluyó a una concentración de 0.5µM con una solución buffer (120mM de KCl, 20mM de Hepes, pH 7.4) y se congeló a -20°C hasta su uso (Amano *et al.*, 2003).

3.3 MADURACIÓN IN VITRO (MIV) DE OVOCITOS

Los ovocitos fueron obtenidos a partir de ovarios procedentes de hembras prepúberes sacrificadas en matadero. El transporte hacia el laboratorio se realizó en un recipiente isoterma con SS a 38°C en un plazo máximo de 1 hora desde el sacrificio de los animales.

Una vez en el laboratorio, los ovarios se sometieron a dos lavados en Cetab, dos en SS atemperada y se procedió a la obtención de los ovocitos en PBS. Los ovocitos se obtuvieron seccionando con hoja de bisturí los folículos ováricos con un diámetro entre 3-6 mm (figura 4A). El contenido folicular se recogió en tubos estériles y se resuspendió en PBS atemperado dejándolo sedimentar aproximadamente durante 5 minutos. Pasado este tiempo, el sedimento se diluyó con PBS fresco. Bajo el estereomicroscopio (Nikon[®]) (figura 4B) y a 20 aumentos, se seleccionaron aquellos ovocitos rodeados por varias capas de células del *cumulus oophorus* con un aspecto compacto y con un citoplasma homogéneo y granulado (figura 4C). Los complejos células del *cumulus oophorus-ovocito* (COCs) se aspiraron con una pipeta Pasteur adelgazada con el extremo romo y conectada a un tubo flexible de silicona.

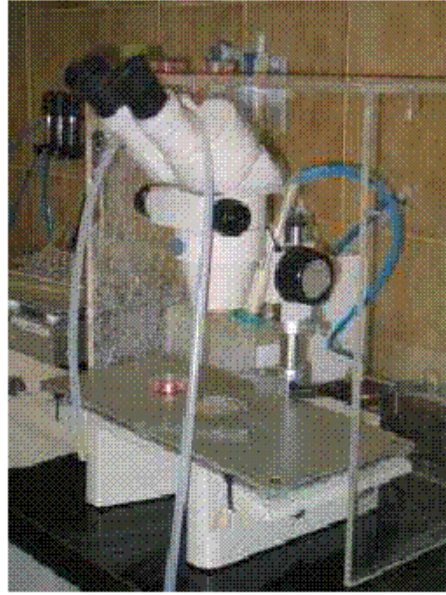
Los COCs seleccionados se lavaron una vez en PBS atemperado y dos veces en medio NCSU-37 previamente equilibrado a 38.5°C en el incubador (Heraeus[®]) al 5% de CO₂ y atmósfera saturada de humedad durante al menos tres horas. El cultivo se llevó a cabo en grupos de 45-50 COCs en un volumen de medio de 500µl. Pasadas 20-22 horas de cultivo, los COCs fueron transferidos a medio NCSU-37 libre de PMSG, HCG y dbAMPc donde se lavaron dos veces y se cultivaron durante 20-22 horas (Funahashi y Day, 1993).

Para las experiencias con premaduración en roscovitina, los COCs seleccionados y lavados en los medios de cultivo apropiados se dispusieron en grupos de 45-50 ovocitos en un volumen de 500µl de NCSU-37 libre de PMSG, HCG y dbAMPc en presencia del inhibidor meiótico a 50µM durante un período de 22-28h. Posteriormente estos ovocitos se maduraron siguiendo el protocolo anteriormente citado (Funahashi y Day, 1993).

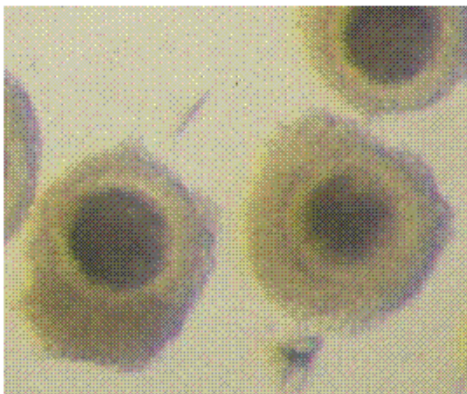
FIGURA 4. A) Sección de folículos ováricos con bisturí. B) Estereomicroscopio Nikon para selección de ovocitos. C) Ovocitos inmaduros con células del *cumulus oophorus* compactas. D) Ovocitos maduros con células del *cumulus oophorus* expandidas



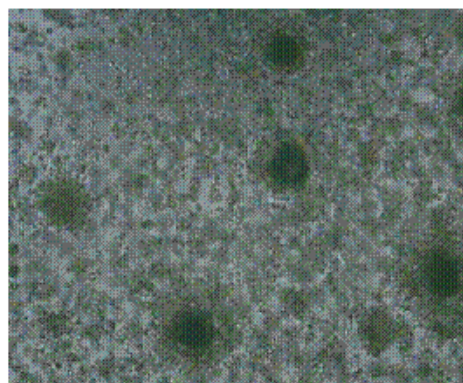
A



B



C

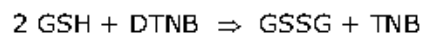


D

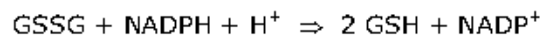
3.4 VALORACIÓN DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE GSH

Para medir la concentración intracelular de glutatión en los ovocitos al final del periodo de MIV se siguió el método descrito por Tietze (1969). Este método está basado en el ensayo cíclico de la enzima 5,5-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico)-glutatión reductasa (DTNB-GSSG) que detecta en los ovocitos tanto el glutatión reducido como el oxidado. Las modificaciones descritas aquí corresponden básicamente a las realizadas por Anderson (1985).

Este ensayo cíclico tiene lugar en dos pasos. En el primero de ellos el glutatión reducido en presencia de DTNB se oxida:



Y en un segundo paso la enzima DTNB-GSSG reductasa cataliza la reacción siguiente:



Siendo:

GSH: forma reducida del glutatión.

GSSG: forma oxidada del glutatión.

DTNB: 5,5-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico).

TNB: 5-thio-2-ácido nitrobenzoico.

NADPH: forma reducida del fosfato del dinucleótido de nicotinamida y de adenina.

NADP⁺: forma oxidada del fosfato del dinucleótido de nicotinamida y de adenina.

El contenido total de glutatión puede estimarse a partir de la producción de TNB que se determina a una absorbancia de 412 nm (UV).

Los **reactivos empleados** fueron los siguientes:

- Ácido fosfórico (H_3PO_4).
- Fosfato sódico hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$).
- Fosfato sódico (Na_2HPO_4).
- Ácido etilen-diamino-tetracético (EDTA).
- DTNB.
- GSH.
- DTNB-GSSG reductasa.
- NADPH.

Las soluciones necesarias para realizar el ensayo se prepararon con agua purificada a las concentraciones que se indican en la tabla 6.

TABLA 6. Soluciones para el ensayo de glutatión.

Componente	Concentración
H_3PO_4	1.25 M
$\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$	0.2 M
Na_2HPO_4	0.2 M
EDTA	10 mM
DTNB	6 mM
Glutatión reductasa	266 UI/ml

A partir de estas soluciones se prepararon las soluciones tampón stock y de NADPH:

- Solución tampón stock: se preparó una solución 0.2 M de fosfato sódico hidratado y 10 mM de EDTA (solución A). Se preparó otra solución similar pero con fosfato sódico (solución B). Finalmente la solución tampón stock se preparó mezclando las soluciones A y B hasta conseguir un pH final de 7.2.

- Solución de NADPH: consistió en una solución de 0.3 mg de NADPH por ml de solución tampón stock.

Todas las soluciones se prepararon en el día de la realización del ensayo de glutatión, excepto la solución tampón stock y la solución de ácido fosfórico, que se prepararon previamente y se conservaron a temperatura ambiente.

Las muestras se prepararon siguiendo la metodología descrita por Funahashi *et al.* (1994b) y que resumimos a continuación. Las células del *cumulus oophorus* se eliminaron por sucesivos pases de los COCs a través de una pipeta automática (Nichiryo®). A continuación, los ovocitos desnudos se lavaron tres veces en solución tampón stock tomándose finalmente muestras de 30 ovocitos en un volumen de 5µl. Las muestras se depositaron en un tubo Eppendorf al que se le añadieron 5µl de ácido fosfórico 1.25M e inmediatamente fueron almacenadas a -20°C hasta su posterior análisis.

Los patrones se prepararon en el momento de realizar el ensayo a partir de 5 soluciones de GSH a distintas concentraciones conocidas: 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.5mM. Para cada uno de ellos se mezclaron 5µl de la solución de GSH correspondiente y 5µl de ácido fosfórico 1.25M. El patrón "cero" se preparó a partir de 5µl de PBS y 5µl de ácido fosfórico 1.25M.

Las muestras de ovocitos se descongelaron a temperatura ambiente y seguidamente se añadió a cada una de ellas un volumen de 700µl de solución de NADPH, 100µl de solución de DTNB y 190µl de agua purificada. Se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 minutos pasados los cuales se añadieron 10 µl de GSH reductasa para iniciar la reacción. A continuación las muestras se introdujeron en un espectrofotómetro (Beckman DU-40) donde se valoró la formación de TNB a una absorbancia de 412 nm (UV) cada 30 segundos durante dos minutos. Los patrones se trataron bajo las mismas condiciones.

La concentración de GSH en cada una de las muestras se determinó por comparación con la curva estándar preparada con los patrones. La cantidad total de glutatión se dividió por el número de ovocitos en la muestra para obtener el contenido total de GSH por ovocito.

3.5 PROCESADO DE LOS ESPERMATOZOIDES

El semen utilizado procedió de verracos (Landrace x Pietrain) de fertilidad probada pertenecientes al centro de inseminación artificial de la granja Lo Navarro S.A. (Murcia, España).

La recogida de semen se realizó mediante el método manual tomando únicamente la fracción rica del eyaculado. Tras la recogida, se procedió a la preparación de las dosis seminales mediante dilución en BTS a una concentración aproximada de 3×10^7 espermatozoides por mililitro, que posteriormente fue transportada al laboratorio. Una alícuota de 10 mililitros de esta dosis se centrifugó a 1200g durante 3 min y el sedimento resultante se diluyó con la solución de PBS suplementado ajustando la concentración a 5×10^5 espermatozoides/ml.

3.6 INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES

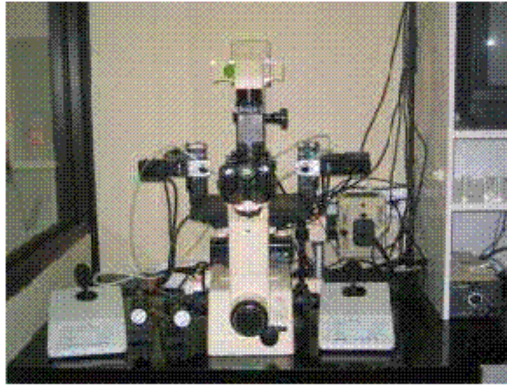
Tras la maduración de los ovocitos (figura 4D), se procedió a la eliminación de las células del *cumulus* mediante sucesivos pases de los COCs a través de una pipeta automática. A continuación, los ovocitos denudados se lavaron dos veces en la solución de PBS suplementado y finalmente fueron colocados en las placas de microinyección.

Sobre las placas donde se realizó la microinyección (*Falcon*[®] petri dish 50x9mm) se dispusieron varias gotas centrales de 4µl de la solución de PBS suplementado con 1µl de semen, rodeadas por un número variable de gotas del medio con los ovocitos. Cada gota de 4µl contenía un ovocito. Las microgotas se recubrieron con aceite mineral (*embryo tested*) distribuido por toda la placa de microinyección.

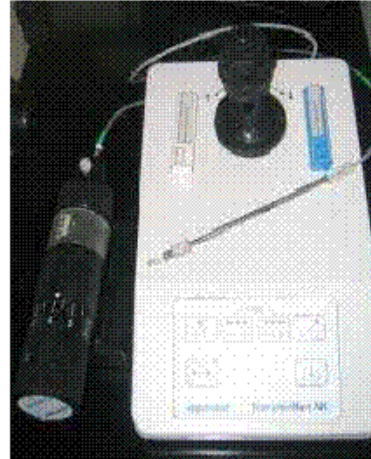
La ICSI se realizó con un microscopio invertido Nikon[®] Diaphot 300 con los correspondientes micromanipuladores *TransferMan*[®] NK (*Eppendorf*) y microinyectores *CellTram Air/CellTram Oil* (*Eppendorf*) (figura 5A y 5B). Una vez preparada la placa se procedió a la microinyección. Mediante una pipeta *Eppendorf*[®] *Custom Tip sterile* (diámetro interno 8µm) se aspiró un pequeño volumen del medio libre de espermatozoides, y a continuación se dispuso en una gota que contenía espermatozoides donde se seleccionó e inmovilizó al espermatozoide que íbamos a microinyectar, aspirando desde la cola de forma que la cabeza espermática quedaba más cerca de la entrada de la pipeta. Una vez tuvimos al espermatozoide se procedió a la captura del ovocito mediante la pipeta de sujeción (*Eppendorf*[®] *Sterile VacuTips*), colocando el ovocito previamente madurado y denudado con el corpúsculo polar en posición de

6 ó 12 horarias. A continuación, se presionó con la pipeta de microinyección en la posición de las 3 horarias para atravesar la zona pelúcida y la membrana plasmática (figura 5C). Se aspiró una pequeña cantidad de citoplasma para confirmar que se había atravesado la membrana plasmática del ovocito, y el espermatozoide se inyectó en el interior del citoplasma. Por último, se retiró la pipeta de microinyección y se liberó al ovocito. Tras la microinyección, los ovocitos se lavaron en el medio correspondiente según la experiencia y se dispusieron en el incubador en unas condiciones de 38.5°C, 5% de CO₂ y atmósfera saturada de humedad. La formación pronuclear se valoró sobre las 22 horas después de la microinyección, considerándose como fecundados los ovocitos con dos pronúcleos.

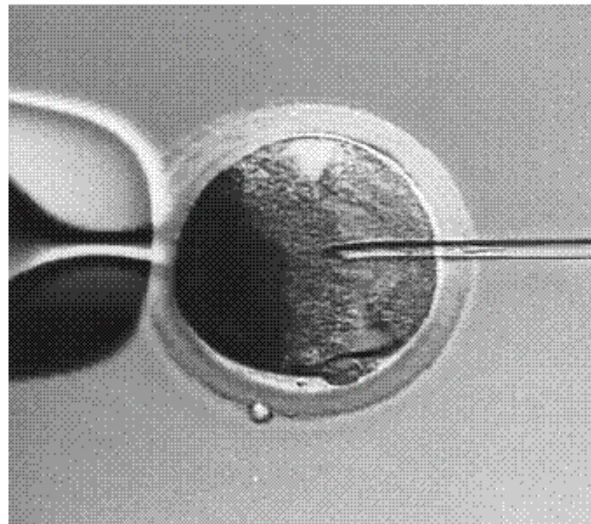
FIGURA 5. A) Microscopio invertido Nikon® Diaphot 300 con los correspondientes micromanipuladores *TransferMan® NK* (Eppendorf) y microinyectores *CellTram Air/CellTram Oil* (Eppendorf). B) Imagen ampliada microinyector y micromanipulador. C) Inyección intracitoplasmática de espermatozoide con pipeta de sujeción y pipeta de inyección, ovocito con CP visible a las 6 horarias.



A



B



C

3.7 CULTIVO DE EMBRIONES

A las 20-24 horas de la fecundación *in vitro*, los presuntos cigotos se trasladaron a medio NCSU-23 previamente equilibrado. En este medio se lavaron 2 veces y se cultivaron durante 24 horas en placas de Petri con un volumen de 0.5 ml de medio. Pasado este tiempo, se seleccionaron bajo el estereomicroscopio únicamente aquellos embriones que se encontraban divididos en estadio de 2-4 células, y se trasladaron a placas de 0.5 ml con medio NCSU-23 fresco. El cultivo de embriones se mantuvo en estas condiciones hasta los 7 días postfecundación a 38.5°C de temperatura y 5% de CO₂ en aire saturado de humedad.

3.8 VALORACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS RESULTADOS

3.8.1 VALORACIÓN DEL ESTADÍO NUCLEAR

Para valorar el estadio nuclear de los ovocitos cultivados en roscovitina y la progresión meiótica de éstos tras la MIV se fijaron siguiendo la técnica descrita por Chang (1952) con ligeras modificaciones (Coy, 1992). Los ovocitos permanecieron en una solución fijadora de etanol absoluto: ácido acético (3:1 v/v) durante 24 horas tras las cuales se tiñeron con colorante lacmoid al 1%.

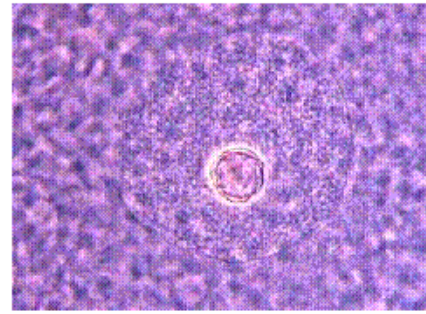
Tras la tinción, las preparaciones se visualizaron a 200-400 aumentos en microscopio de contraste de fases (Nikon®) y se clasificaron como GV-0, GV-I, GV-II, GV-III, GV-IV, Met I, Ana I, Tel I, Met II (figura 6) de acuerdo con los criterios morfológicos de caracterización descritos por Funahashi *et al.* (1997a). GV-0 caracterizado por un nucleolo evidente y cromatina filamentosa localizada en toda el área de la GV; GV-I caracterizado por un nucleolo evidente y cromatina dispuesta en forma de herradura de caballo alrededor del nucleolo; GV-II, caracterizado por un nucleolo evidente con cromatina en forma de herradura de caballo alrededor del nucleolo, pero con algunos agregados de cromatina teñidos localizados principalmente alrededor de la cromatina; GV-III, caracterizado por una red irregular de filamentos bivalentes en el área de la vesícula germinal y sin nucleolo

evidente y GV-IV, caracterizado por la diacinesis de la cromatina. En nuestro estudio, el estadio de GVBD fue incluido dentro de GV-IV.

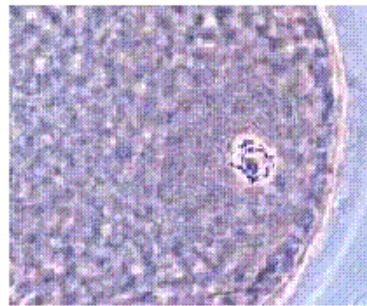
FIGURA 6. Estadio nuclear de los ovocitos teñidos con lacmoid al 1%, microscopio de contraste de fases, 400X. A) GV0, nucleolo evidente y cromatina filamentosa localizada en toda el área; B) GV-I, nucleolo evidente y cromatina dispuesta en forma de herradura de caballo alrededor del nucleolo; C) GV-II, nucleolo evidente con cromatina en forma de herradura de caballo alrededor, pero con algunos agregados de cromatina teñidos; D) GV-III, caracterizado por una red irregular de filamentos bivalentes en el área de la vesícula germinal y sin nucleolo evidente y E) GV-IV, diacinesis de la cromatina.



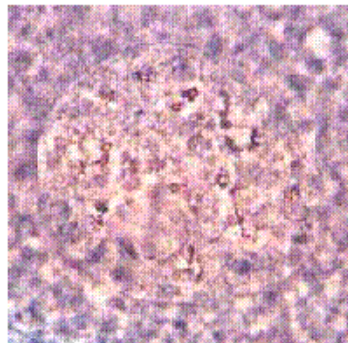
A



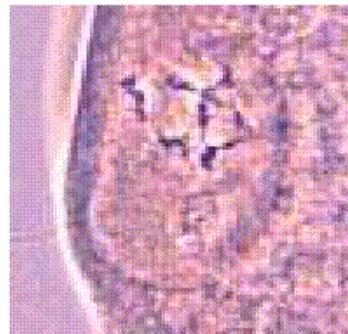
B



C

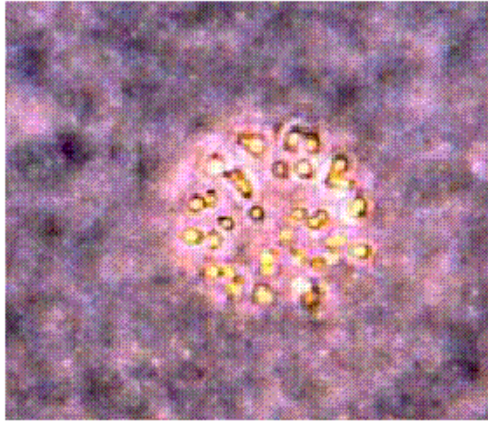


D



E

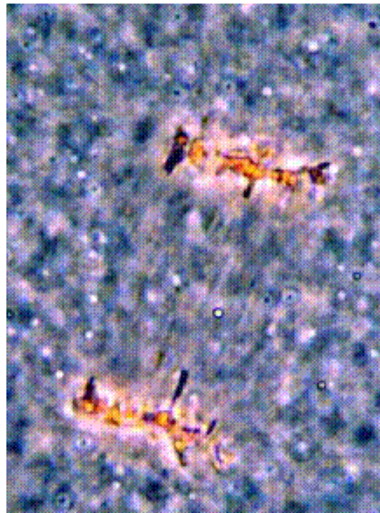
FIGURA 3. Estadio nuclear de los ovocitos teñidos con lacmoid al 1%, microscopio de contraste de fases (1000X). **F)** Ovocito en Metafase I con los cromosomas dispuestos en el ecuador del huso acromático. **G)** ovocito en Anafase I con los cromosomas desplazándose hacia los polos del huso. **H)** ovocito en telofase I con los cromosomas en el polo del huso. **I)** Ovocito en Metafase II con los cromosomas dispuestos en el ecuador del huso acromático y el primer corpúsculo polar.



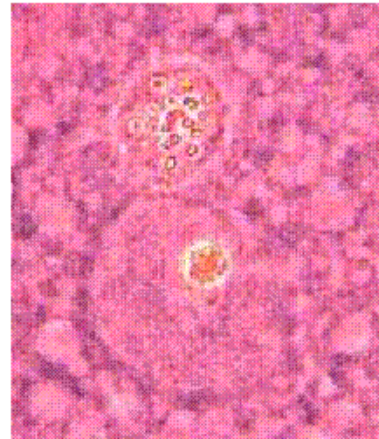
F



G



H



I

3.8.2 VALORACIÓN DE LA FORMACIÓN PRONUCLEAR

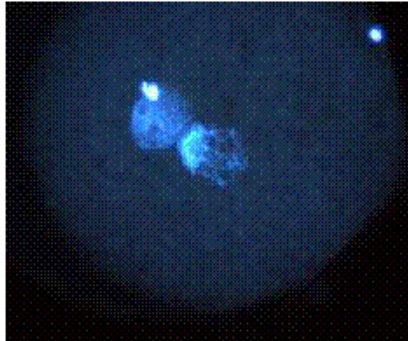
Dependiendo de la experiencia realizada, los ovocitos inyectados se evaluaron siguiendo distintas metodologías. En la experiencia 1 y el primer apartado de ICSI de la experiencia 2, los ovocitos se evaluaron a las 22h tras la ICSI con Iacmoid. El resto de experiencias de ICSI se valoraron mediante la tinción con el fluorocromo Hoechst 33342. Brevemente, los ovocitos se fijaron en glutaraldehído al 0.5% en PBS durante 30 minutos. A continuación los ovocitos fueron lavados de nuevo en PBS y teñidos en la oscuridad con una solución de Hoechst 1mg/ml durante 15 minutos. Por último, a los ovocitos lavados en PBS, se les adicionaron 20 µl de una solución de montaje compuesta de Hoechst 1mg/ml, PBS (6.25ml) y glicerol (6.25ml) de la que fueron transferidos en una pipeta Pasteur a un portaobjetos sobre el que se depositó un cubreobjetos que se selló con esmalte.

Tras la tinción, los ovocitos fueron evaluados a 200-400 aumentos con un microscopio Leika® modelo DMLS y filtro de fluorescencia con rango de excitación para luz ultravioleta. Se consideraron ovocitos no activados aquellos que mostraron la placa metafásica, independientemente del estadio del espermatozoide considerándose el resto se como ovocitos activados. Entre estos últimos se encontraban aquellos con presencia de pronúcleo femenino (independientemente del estadio del espermatozoide), estadio de dos células o partenogénéticos. Se consideraron ovocitos fecundados aquellos que tuvieran presentes 2 PN, se viera o no el CP en la tinción y aquellos en estadio de dos células (figura 7).

Las variables estudiadas tras la ICSI fueron las siguientes:

- El porcentaje de ovocitos degenerados (**% Degeneración**) con respecto al total de ovocitos inyectados.
- El porcentaje de ovocitos activados (**% Activación**) con respecto a los no degenerados. Dentro de estos ovocitos se encontraban aquellos ovocitos en estadio anterior a 2PN (1PN y una cabeza espermática compacta o descondensada; **% Pre-2PN**), ovocitos en estadio de 2PN (**% 2PN**), estadio de 2 células (**% de embriones**) y ovocitos sin clasificar (**% Otros**).

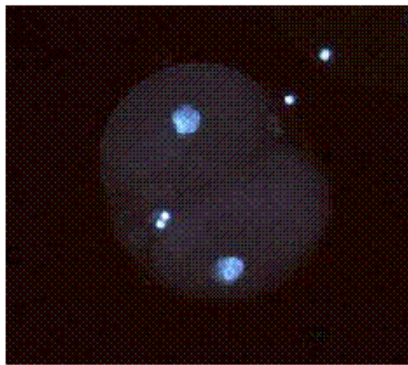
FIGURA 7. Valoración de la fecundación por ICSI mediante la tinción con lacmoid y/o tinción con Hoechst 33342. Microscopio de epifluorescencia. **A)** Ovocito porcino con dos pronúcleos. Hoechst 33342 (400X). **B)** Ovocito porcino con dos pronúcleos. Lacmoid (1000X). **C)** Embrión de 2 células. Hoechst 33342 (200X). **D)** Embrión de 2 células. Estereomicroscopio (200X). **E)** Ovocito porcino con tres pronúcleos. Hoechst 33342 (400X). **F)** Ovocito porcino con un pronúcleo y una cabeza espermática descondensada (1000X). **G)** Ovocito porcino en metafase II y cabeza espermática compacta (200X).



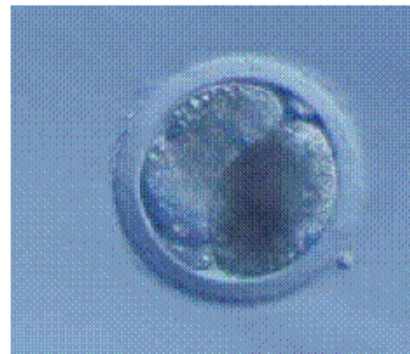
A



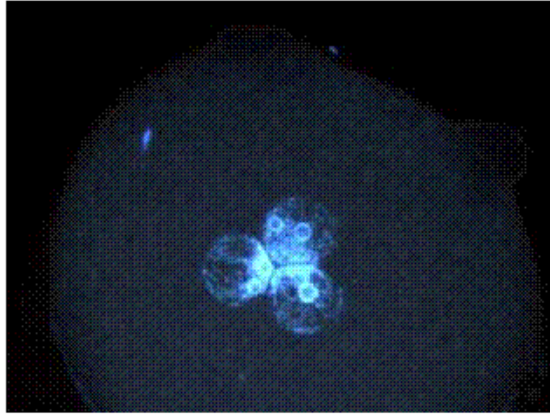
B



C



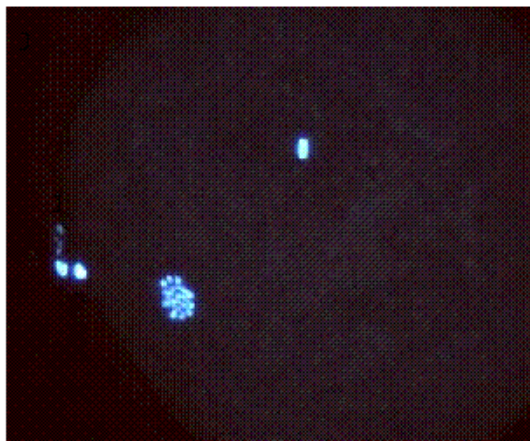
D



E



F



G

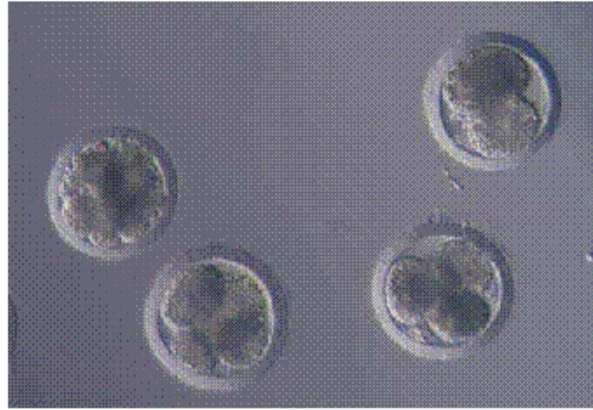
3.8.3 VALORACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO

Se consideraron embriones divididos aquellos que a las 48 horas postfecundación se encontraban en estadio de 2-4 células con blastómeras homogéneas. Por otra parte, una vez finalizado el período de cultivo de 7 días, se aislaron bajo el estereomicroscopio a 50 aumentos aquellos embriones con aspecto de blastocisto y se trasladaron a PBS atemperado. Seguidamente, se procesaron para valorar la calidad embrionaria según el número de blastómeros por embrión siguiendo la técnica de Dobrinsky *et al.* (1996). Brevemente, los blastocistos se fijaron en alcohol sobre un portaobjetos durante un período de 24h y posteriormente se tiñeron con una solución de Hoescht 33342 al 1% en PBS para teñir los núcleos celulares. Por último, se visualizaron inmediatamente en un microscopio de fluorescencia a 400 aumentos y 495 nm de longitud de onda. Se contabilizaron todos los núcleos considerándose el número total de células por blastocisto como el número total de núcleos teñidos (figura 8).

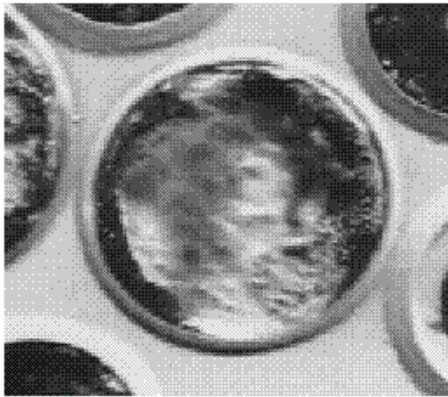
Las variables estudiadas en esta experiencia se detallan a continuación:

- Porcentaje de división embrionaria (**% División**): se contabilizó el número de embriones en estadio de 2-4 células con respecto al total de los cigotos que iniciaron el cultivo embrionario.
- Porcentaje de blastocistos (**% Blastocistos**): se valoró como el número de blastocistos con respecto al total de embriones divididos.
- Número medio de células por blastocisto (**N céls/blastocisto**): se calculó como el número medio de núcleos teñidos por blastocisto.

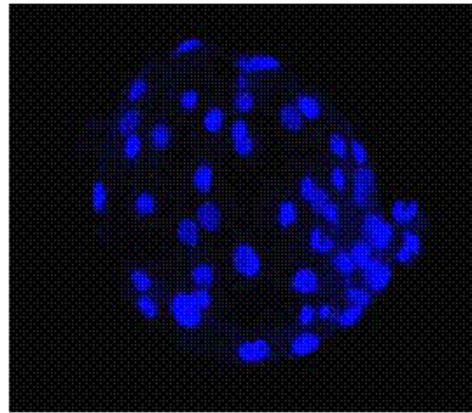
FIGURA 8. A) Embriones porcinos en estadio 2-4 células. Estereomicroscopio (20X). B) Blastocisto cavitado mostrando el blastocele y la masa celular interna. C) Blastocisto teñido con Hoescht 33342 (núcleos de los blastómeros teñidos en azul), epifluorescencia (200X).



A



B



C

3.9 TRANSFERENCIAS DE EMBRIONES

Para la realización de las transferencias se utilizaron 20 hembras cruce de Landrace X Large White múltiparas (2-4 partos) fisiológicamente sincronizadas tras el destete. La detección del celo se realizó mediante verracos recela 2 veces por día. Seguidamente con un ecógrafo modelo Echoscán T-100, se determinó el desarrollo folicular (3-6mm). A las 72h de la ovulación se procedió a realizar las transferencias (figura 9).

3.9.1 TRANSPORTE DE LOS CIGOTOS

Una vez inyectados los ovocitos se visualizaron bajo un estereomicroscopio para localizarlos. A continuación, se introdujeron mediante aspiración utilizando un auxiliar de pipeteado (Micro-Classic®, Brand) conectado a un catéter *Tom Cat* (Kendall Co., Mansfield, MA, USA) con solución PBS atemperada a 38°C. El transporte se realizó en una estufa portátil a 38°C. La carga del catéter se realizó de la siguiente manera: en primer lugar se dispuso una columna con el medio de cultivo, a continuación se dejó un espacio con aire y luego se cargaron los embriones contenidos en el medio. Posteriormente, se dispuso la segunda columna de aire y la última nuevamente con el medio. La columna con el medio de cultivo (PBS), ubicada en el extremo abierto del catéter, limpia a este en el momento de la descarga. Las presencias de las columnas con aire impiden el desplazamiento de la columna central, que contiene los embriones y la última garantiza la descarga del embrión por efecto de arrastre.

En todos los casos se procuró que el tiempo transcurrido desde la introducción de los cigotos en el catéter hasta la llegada a la granja no fuera superior a 1h.

3.9.2 ANESTESIA

La anestesia fue realizada con tiopental sódico (Penthotal sódico, Lab Abbott) previa sedación con 120mg de azaperona (*Stressnil*®, Lab Janssen Pharmaceutica) administrados por vía intramuscular. El tiopental fue inyectado en la vena marginal de la oreja a una dilución 1:10 (v/v) para

inducir el estado de anestesia. Posteriormente este estado se mantuvo con la misma droga administrada a una dilución de 1:20 (v/v).

Los animales anestesiados se dispusieron en decúbito supino y fueron inmovilizados sobre la mesa de operaciones.

3.9.3 APERTURA DE LA CAVIDAD ABDOMINAL

Se procedió a la adecuada antisepsia (*Betadine*[®], Lab Sarget) de la región abdominal en la zona correspondiente a las dos últimas mamas, y al aislamiento del campo quirúrgico mediante la colocación de un paño estéril. A continuación, se realizó una laparotomía ventral mediante incisión con bisturí y se procedió a la disección roma de la grasa subcutánea, incidiendo sobre la fascia y el músculo recto abdominal hasta la visualización del peritoneo. Este último se abrió mediante un pequeño corte con el extremo de una tijera y a continuación se colocó un separador abdominal. Inmediatamente, se localizó un cuerno uterino y se exteriorizó hasta poder visualizar el oviducto y el ovario.

Posteriormente, se observaron con detenimiento los ovarios contándose el número de cuerpos hemorrágicos para asegurarnos que la cerda había completado el proceso de ovulación. A continuación, se localizó en el interior de la bolsa ovárica la abertura del infundíbulo y rápidamente se introdujo el catéter con los cigotos previamente obtenidos por ICSI. Una vez en el interior de los primeros 4-5cm de la luz del oviducto, el extremo del catéter se sujetó suavemente con los dedos a modo de anillo procurando que la adaptación fuera lo más perfecta posible. Mediante la ayuda de una jeringuilla de 1ml conectada al catéter se impulsó el contenido de éste a través del oviducto. Finalmente, se retiró el catéter y se comprobó con la ayuda de un estereomicroscopio la ausencia de cigotos en el mismo.

El cuerno uterino, junto con el oviducto y ovario manipulados fueron lavados con solución salina fisiológica atemperada y reintroducidos en la cavidad abdominal.

3.9.4 CIERRE DE LA CAVIDAD ABDOMINAL

La cavidad abdominal se cerró en 4 planos. En los tres primeros, correspondientes a la capa muscular, peritoneo, fascia de la muscular y al tejido subcutáneo con la grasa propia, se utilizó catgut crómico del número 3 y se realizó una sutura continua con puntos de refuerzo. En cuanto al plano correspondiente a la piel se suturó mediante puntos simples con seda nº 3 y 4.

Para prevenir posibles infecciones se le administró al animal amoxicilina con efecto retardado (Clamoxyl® L.A.) durante 4-5 días y sobre la herida se extendió una capa de Betadine.

3.9.5 DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN

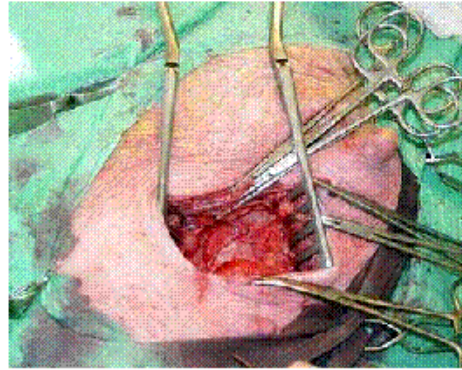
Las hembras intervenidas se mantuvieron bajo las condiciones de granja convencionales y a los 21-25 días de la transferencia embrionaria se llevó a cabo el diagnóstico de gestación mediante técnicas de ultrasonografía (Echoscan T-100).

Se consideró positiva la gestación cuando se visualizaron las vesículas embrionarias de un tamaño de 15 a 20mm de diámetro. Se observaron como áreas bien definidas, regulares y anecoicas.

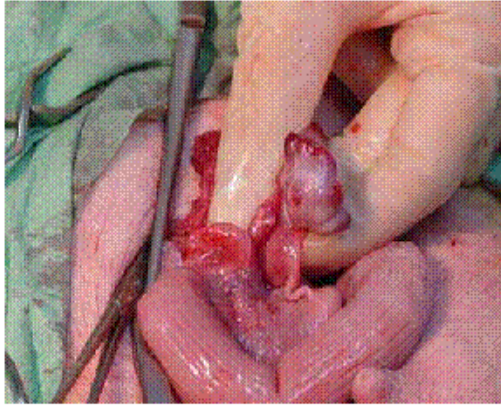
FIGURA 9. Secuencia de la transferencia de embriones. A) Aislamiento del campo quirúrgico, B) Laparotomía ventral, C y D) Localización del cuerno uterino y exteriorización del oviducto y ovario, E) Localización en la bolsa ovárica de la abertura del infundíbulo e introducción del catéter con los cigotos, F) Reintroducción de cuerno uterino, oviducto y ovario en la cavidad abdominal, G) Cierre de la cavidad abdominal, fascia muscular y peritoneo, H) Cierre de la piel con puntos simples.



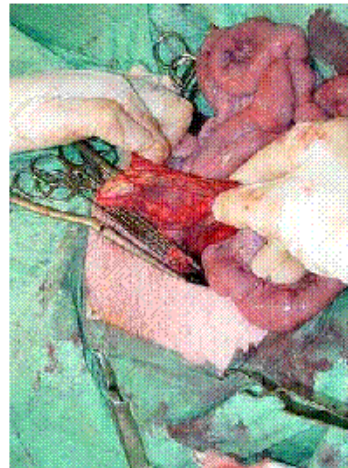
A



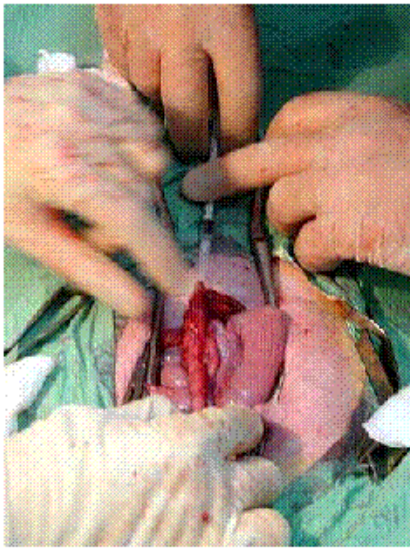
B



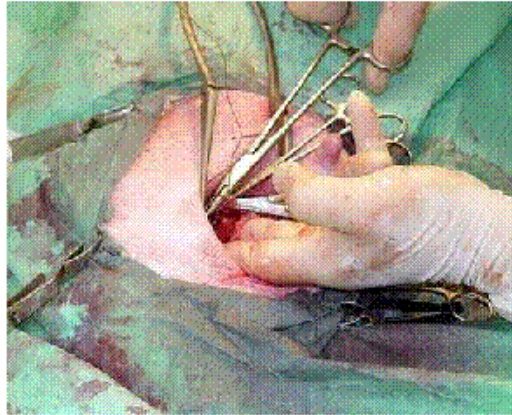
C



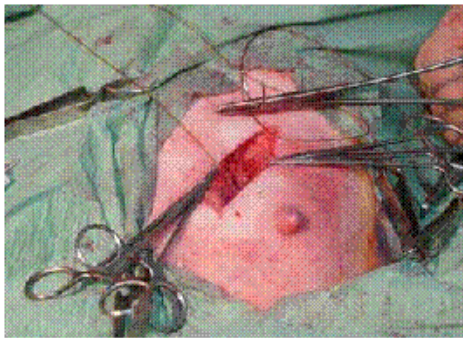
D



E



F



G



H

3.10 DISEÑO EXPERIMENTAL

El trabajo se dividió en cuatro experiencias que se detallan a continuación y se reflejan gráficamente en el figura 10.

EXPERIENCIA 1. EFECTO DEL TIEMPO DE CULTIVO EN MEDIO TALP SOBRE LOS PARÁMETROS DE ICSI Y DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO

Esta experiencia se diseñó para optimizar la secuencia de utilización de los medios de fecundación *in vitro* y de cultivo de embriones (FIV y CE). Este efecto se determinó sobre la fecundación y el desarrollo embrionario.

Los COCs fueron madurados *in vitro* siguiendo el protocolo rutinario de nuestro laboratorio, 44h de MIV en NCSU-37 como se ha explicado anteriormente. Posteriormente, los ovocitos fueron inyectados y cultivados a diferentes tiempos en medio TALP. Los tiempos de cultivo empleados fueron 0h (grupo control), 6h y 20h en medio TALP y posterior cultivo en NCSU-23.

La experiencia quedó subdividida en:

Experiencia 1.1: Efecto del tiempo de cultivo en medio TALP sobre los parámetros de ICSI

La evaluación de la fecundación se realizó a las 22h de la inyección. Parte de los cigotos fueron fijados y teñidos con lacmoid, y en ellos se valoraron los siguientes parámetros:

- Porcentaje de activación, porcentaje de degeneración, porcentaje pre-2PN, porcentaje de posibles embriones y porcentaje de otros.

Esta experiencia se llevó a cabo en 6 replicados y el total de ovocitos empleado fue de 361.

Experiencia 1.2: Efecto del tiempo de cultivo en medio TALP sobre el desarrollo embrionario

La evaluación del desarrollo embrionario se realizó tras el cultivo en NCSU-23 como hemos explicado en el apartado de cultivo embrionario. Valorándose:

- Porcentaje de división, porcentaje de blastocistos y número de células por blastocisto.

Esta experiencia se llevó a cabo en 4 replicados y el total ovocitos empleado fue de 258.

EXPERIENCIA 2. EFECTO DE DIFERENTES CAMBIOS EN EL SISTEMA DE MADURACIÓN IN VITRO SOBRE LA ICSI Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO IN VIVO***Experiencia 2.1: Estado nuclear de los ovocitos tras 22h de cultivo en roscovitina***

El propósito de esta experiencia fue el de conocer si el cultivo de los ovocitos en medio NCSU-37 sin suplementación hormonal y sin dbAMPc, y con 50µM de roscovitina (ROS) durante las primeras 22 h de maduración mantienen el estadio nuclear al mismo nivel que los ovocitos recién recogidos del ovario. Como grupo control se emplearon los ovocitos recién recolectados. Además, se utilizaron otros dos grupos: los ovocitos cultivados 22h en NCSU-37 con suplementación hormonal y dbAMPc y los ovocitos cultivados durante 22h en el mismo NCSU-37 sin suplementación. De esta manera, podríamos conocer si el efecto inhibitor de la roscovitina en la progresión nuclear era o no similar al producido por el dbAMPc, que bloquea sólo ovocitos en estadios o anteriores a GV-II, y por otra parte comparar el estadio nuclear de los ovocitos inhibidos por la ROS o por el dbAMPc (grupo ROS y grupo A) y de los ovocitos cultivados en ausencia de inhibidores (grupo B) con el de los ovocitos recién recogidos (control).

Después del cultivo se valoró el estadio nuclear (desde GV-0 hasta MII) en todos los grupos.

Esta experiencia se realizó en 4 replicados con 645 ovocitos.

Experiencia 2.2: Efecto de la roscovitina sobre la progresión nuclear de los ovocitos

Esta experiencia fue realizada para valorar la reversibilidad del tratamiento con roscovitina. Para ello los COCs fueron cultivados en dos grupos, el primero, donde el proceso de MIV fue el empleado normalmente en nuestro laboratorio, y un segundo con premaduración de 22h en roscovitina. El estadio nuclear (desde GV-0 a MII) se valoró mediante la tinción con Hoechst 33342.

Esta experiencia se realizó en 3 replicados con 314 ovocitos.

Experiencia 2.3: Efecto de la roscovitina sobre el contenido en GSH de los ovocitos

Esta experiencia se realizó para determinar el efecto de la roscovitina sobre el contenido intracelular de GSH. Se emplearon como grupos experimentales ovocitos recién recogidos, ovocitos cultivados durante 22h en presencia o ausencia de roscovitina (50 μ M), y ovocitos madurados in vitro con o sin un precultivo de 22h en roscovitina (50 μ M). Se emplearon un total de 960 ovocitos en 7 replicados y el contenido intracelular de GSH se determinó como se describe en la metodología.

Experiencia 2.4: Efecto de la roscovitina sobre la fecundación por ICSI.

El objetivo de esta experiencia fue comparar el efecto de la premaduración con ROS y posterior MIV sobre los parámetros de fecundación por ICSI.

Para ello los COCs se recogieron en el mismo día y se maduraron en dos grupos; por un lado, el grupo control, en el que los COCs fueron madurados según el protocolo normal de MIV; por otro, ovocitos premadurados en roscovitina durante un período de 22h y posteriormente MIV, al igual que el grupo anterior. Las inyecciones fueron realizadas en días sucesivos, cumpliéndose el tiempo de MIV de 44h. Los ovocitos recién inyectados se dispusieron en medio TALP. A las 22h tras la ICSI, todos los

cigotos fueron fijados y teñidos con lacmoid valorándose los siguientes parámetros:

- Porcentaje de activación, porcentaje de degeneración, porcentaje pre-2PN, porcentaje de 2PN, porcentaje de embriones y porcentaje de otros.

La experiencia de ICSI se realizó en 7 replicados con 254 ovocitos inyectados.

Experiencia 2.5: Efecto de la roscovitina sobre el desarrollo embrionario in vivo.

Esta experiencia fue realizada para valorar *in vivo* la viabilidad de los cigotos premadurados en roscovitina, y evitar las dificultades que presenta el cultivo de embriones *in vitro* en la especie porcina.

Para ello los COCs se recogieron en el mismo día y se maduraron en dos grupos; por un lado, el grupo control, en el que los COCs fueron madurados según el protocolo normal de MIV; por otro, ovocitos premadurados en roscovitina durante un período de 22h y posteriormente MIV, al igual que el grupo anterior. Las inyecciones fueron realizadas en días sucesivos, cumpliéndose el tiempo de MIV de 44h. Posteriormente a la inyección se transfirieron los cigotos a hembras receptoras.

Se realizaron 20 transferencias (10 hembras para el grupo control y 10 para el grupo de roscovitina) con una media de 62 ovocitos transferidos por hembra.

Experiencia 2.6. Efecto del tiempo de MIV sobre la fecundación por ICSI de ovocitos porcinos premadurados en roscovitina.

Este estudio se llevó a cabo para evaluar el efecto del tiempo de maduración sobre diferentes parámetros de fecundación mediante ICSI. Para ello los COCs fueron premadurados en roscovitina (50 μ M), y posteriormente se maduraron según el protocolo normal durante 36h, 40h y 44h. A continuación los cigotos se transfirieron a medio TALP durante un

período de 20-24h y posteriormente se fijaron y tiñeron con Hoechst 33342. Las variables estudiadas fueron las siguientes:

- Porcentaje de activación, porcentaje de degeneración, porcentaje de pre-2PN, porcentaje de 2PN y, porcentaje de otros.

Esta experiencia se realizó en 7 replicados con un total de 456 ovocitos inyectados.

Experiencia 2.7: Efecto de la premaduración con roscovitina sobre los resultados de ICSI en ovocitos porcinos madurados durante 36h.

Al observar en el apartado anterior que el grupo de 36h presentaba mayores porcentajes de fecundación, esta experiencia se diseñó para determinar si este efecto venía o no dado por la premaduración en roscovitina. El objetivo de esta experiencia fue comparar el efecto de la premaduración con ROS y posterior MIV de 36h sobre los parámetros de fecundación por ICSI.

Para ello los COCs se recogieron en el mismo día y se maduraron en dos grupos; por un lado, el grupo control, en el que los COCs fueron madurados durante 36h; por otro, ovocitos premadurados en roscovitina durante un período de 22-24h y posteriormente MIV de 36h, al igual que el grupo anterior. Las inyecciones fueron realizadas el mismo día, cumpliéndose el tiempo de MIV de 36h. Los ovocitos recién inyectados se dispusieron en medio TALP. A las 22h tras la ICSI, todos los cigotos fueron fijados y teñidos con Hoechst 33342. Las variables estudiadas fueron las siguientes:

- Porcentaje de activación, porcentaje de degeneración, porcentaje de pre-2PN, porcentaje de 2PN y, porcentaje de otros.

Esta experiencia se realizó en 3 replicados con un total de 192 ovocitos inyectados.

EXPERIENCIA 3. EFECTO DEL $InsP_3$ SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO.

El objetivo de esta experiencia fue el de intentar mejorar la activación ovocitaria, y con ello, el porcentaje final de blastocistos mediante la inyección de $InsP_3$ junto con el espermatozoide. Para ello, los COCs se maduraron siguiendo el protocolo normal de MIV durante 40h. La microinyección del $InsP_3$ se realizó siguiendo el mismo protocolo que durante la ICSI. La pipeta de microinyección se llenó de medio con $InsP_3$ o con la solución del tampón. El llenado de la pipeta de inyección fue de aproximadamente la longitud del espermatozoide. Se realizaron 4 grupos de inyección:

- Grupo **control**: ovocitos inyectados únicamente con espermatozoide en el medio que normalmente utilizamos para la realización de la ICSI.
- Grupo **$InsP_3$** : ovocitos inyectados con el espermatozoide conjuntamente con el $InsP_3$.
- Grupo **sham-tampón**: ovocitos inyectados únicamente con el tampón utilizado para diluir el $InsP_3$, de esta manera podríamos valorar si la activación era debida al $InsP_3$ o al tampón.
- Grupo **sham- $InsP_3$** : ovocitos inyectados con el $InsP_3$ sin espermatozoide. De esta manera se valora la capacidad del $InsP_3$ para activar sin presencia del espermatozoide.

La evaluación del desarrollo embrionario se evaluó tras el cultivo en NCSU-23 como hemos explicado en el apartado de cultivo embrionario. Valorándose:

- Porcentaje de división, porcentaje de blastocistos y número de células por blastocisto.

Esta experiencia se realizó en 3 replicados con un total de 215 ovocitos inyectados.

FIGURA 10. Diseño experimental.

NCSU-37_A: NCSU-37 suplementado con eCG, hCG y dbAMP_c

NCSU-37_B: NCSU-37

NCSU-37_{ROS}: NCSU-37 suplementado con 50µM roscovitina

MIV: 22 h en NCSU-37_A seguidas de 22 h en NCSU-37_B

CE: cultivo embriones

Experiencia 1. Efecto del tiempo de cultivo en medio TALP sobre los parámetros de fecundación y desarrollo embrionario *in vitro*.

MIV (44h)	ICSI	Grupo TALP (0h)	NCSU-23	} 22hpi: resultados ICSI CE
		Grupo TALP (6h)	NCSU23	
		Grupo TALP (20h)	NCSU-23	

hpi: horas post-inyección

Experiencia 2. Efecto de la roscovitina sobre la maduración *in vitro*, fecundación por ICSI y desarrollo embrionario *in vivo*.

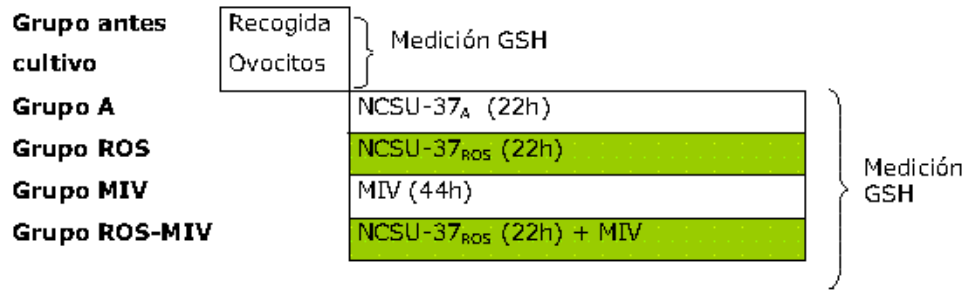
2.1 Estado nuclear de los ovocitos tras 22h de cultivo en roscovitina

Grupo antes cultivo	Recogida Ovocitos	} Valoración nuclear		
			Grupo A	NCSU-37 _A (22h)
			Grupo B	NCSU-37 _B (22h)
			Grupo ROS	NCSU-37 _{ROS} (22h)

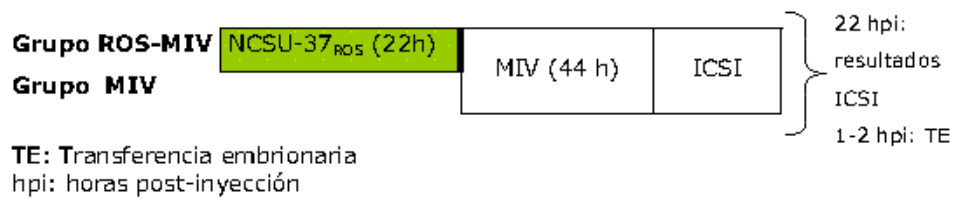
2.2 Progresión nuclear de los ovocitos con premaduración en roscovitina

Grupo ROS-MIV	NCSU-37 _{ROS} (22h)	} Valoración nuclear
Grupo MIV	MIV (44h)	

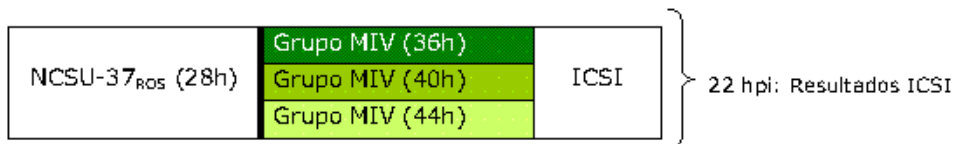
2.3 Contenido intracelular de GSH en ovocitos maduros e inmaduros precultivados con o sin roscovitina



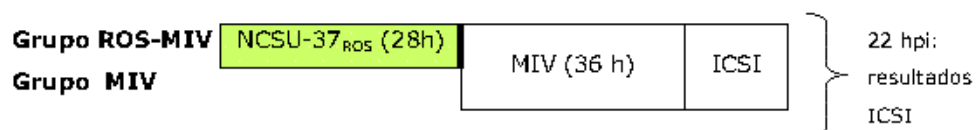
2.4 y 2.5 Efecto de la roscovitina sobre la fecundación por ICSI y desarrollo embrionario *in vivo*

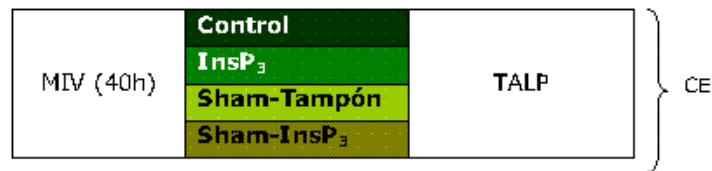


2.6 Efecto del tiempo de MIV sobre la fecundación por ICSI de ovocitos porcinos premadurados en roscovitina



2.7 Efecto de la premaduración con roscovitina en ovocitos madurados durante 36h.



Experiencia 3. Efecto del InsP_3 sobre el desarrollo embrionario *in vitro*.**3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados de las variables estudiadas (porcentaje de activación y degeneración ovocitaria, porcentaje de ovocitos en estadio anterior a 2PN; Pre-2PN, porcentaje de ovocitos con 2 pronúcleos y embriones, otros ovocitos, porcentaje de división embrionaria, porcentaje de blastocistos y número medio de células por blastocisto) se expresan como medias \pm error estándar de la media (SEM).

Para todo el estudio estadístico se utilizó el programa SPSS 11.5 para Windows. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), con una transformación previa de los porcentajes según el modelo binomial de parámetros. Cuando el ANOVA reveló un efecto significativo los valores fueron comparados por el Test de *Tukey*. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas que alcanzaron niveles de probabilidad de $p < 0.05$.

En la primera experiencia se aplicó un ANOVA de una vía donde el efecto fijo fue las horas de cultivo en medio TALP y las variables estudiadas fueron: porcentaje de degeneración, porcentaje de activación, porcentaje pre-2PN, porcentaje de 2PN, porcentaje de embriones y porcentaje de otros. En la segunda experiencia, la variable utilizada fue el estadio nuclear (desde GV-0 a MII) para los dos primeros apartados y el contenido intracelular de GSH para el tercero. En relación a los apartados de ICSI, las variables analizadas fueron el porcentaje de degeneración, porcentaje de activación, porcentaje pre-2PN, porcentaje de 2PN, porcentaje de embriones y porcentaje de otros. Los efectos fijos fueron el precultivo en roscovitina y las horas de MIV. Los datos de las transferencias quirúrgicas no se analizaron, se describieron. En la tercera experiencia el efecto fijo fue la inyección del InsP_3 y las variables analizadas: porcentaje de división, porcentaje de blastocistos y número de células por blastocisto.

RESULTADOS

4.1 EFECTO DEL TIEMPO DE CULTIVO EN MEDIO TALP SOBRE LOS PARÁMETROS DE ICSI Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO

4.2 EFECTO DE LA ROSCOVITINA SOBRE LA MADURACIÓN IN VITRO, ICSI Y DESARROLLO EMBRIONARIO IN VIVO

4.3 EFECTO DEL InsP_3 SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO

4

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en cada una de las experiencias del presente trabajo se muestran a continuación.

4.1 EFECTO DEL TIEMPO DE CULTIVO EN MEDIO TALP SOBRE LOS PARÁMETROS DE ICSI Y DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO

4.1.1 Efecto del tiempo de cultivo en medio TALP sobre los parámetros de ICSI

El paso de los ovocitos recién inyectados a medio TALP antes de introducirlos en el medio de cultivo de embriones NCSU-23 resultó beneficioso para el rendimiento de la técnica como se explica a continuación.

Los resultados del porcentaje de activación y degeneración fueron significativamente diferentes entre los tres grupos, oscilando entre el 85% y el 18% para activación y degeneración, respectivamente. Sin embargo, el porcentaje de embriones fue superior para el grupo de 6h y 20h (9.72 ± 3.92 y 10.68 ± 3.06) con respecto al grupo de 0h (0%) ($p < 0.05$). Los resultados se muestran en la tabla 7.

TABLA 7. Media y SEM para los distintos parámetros de fecundación de los ovocitos inyectados y cultivados durante diferentes períodos de tiempo en medio TALP, en 6 replicados. Evaluación a las 22 hpi.

TALP h	Deg (%)	Act (%)	Pre-2PN*	2PN*	Embriones*	Otros*
0h						
N=152	12.50±3.26	91.21±2.98	28.92±5.01	55.42±5.49	0 b	15.66±4.01
6h						
N=105	23.81±4.18	90.00±3.38	22.22±4.93	59.72±5.82	9.72±3.92 a	8.33±3.28
20h						
N=104	19.08±0.03	83.74±3.34	26.21±4.35	56.31±4.91	10.68±3.06 a	6.80±2.42
P	0.1076	0.2003	0.6393	0.8528	0.0096	0.1160

* En base al porcentaje de activados

a, b; subíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

4.1.2 Efecto del tiempo de cultivo en medio TALP sobre el desarrollo embrionario

No se encontraron diferencias significativas para ninguna de las variables estudiadas. Cabe destacar que los porcentajes de división se encuentran alrededor de un 60% con unos porcentajes de blastocistos muy bajos para ambos grupos. El número de blastocistos obtenidos fue de 3 para control, 7 para el grupo de 6h y un solo blastocisto para el grupo de 0h en TALP. Los resultados se muestran en la tabla 8.

TABLA 8. Media y SEM para los distintos parámetros de desarrollo embrionario tras la ICSI y cultivo durante diferentes períodos de tiempo en medio TALP, en 4 replicados. Porcentaje división evaluado a las 48 hpi y porcentaje blastocistos a los 7 días post- inyección.

TALP h	División (%)	Blastocistos (%)	N céls/blastocisto
0h N=91	54.55±5.71	4.76±3.33	50
6h N=90	64.44±5.07	12.07±4.31	41.71±8.32
20h N=77	68.13±4.91	4.84±2.75	37.66±8.69
P	0.1791	0.2424	0.8726

4.2 EFECTO DE LA ROSCOVITINA SOBRE LA MADURACIÓN IN VITRO, ICSI Y DESARROLLO EMBRIONARIO IN VIVO

Los resultados de esta experiencia se dividen en el efecto de la roscovitina sobre la maduración, valorados en los ovocitos recién recogidos, cultivados en medio A, en medio B y en presencia del inhibidor (ROS) durante 22 h y después de la MIV con o sin precultivo en ROS; el efecto sobre la ICSI, valorado en los ovocitos fijados tras la inyección; y el efecto sobre el desarrollo embrionario in vivo mediante las transferencias embrionarias.

4.2.1 Estado nuclear de los ovocitos tras 22h de cultivo en roscovitina

Los resultados de esta primera experiencia nos muestran que la roscovitina en una concentración de 50µM es capaz de inhibir la reanudación meiótica después de 22h de cultivo, obteniéndose en el grupo ROS unos porcentajes mayores de ovocitos en estadio de GV-I y unos porcentajes menores de GV-III que en los grupos A ó B (tabla 9 y figura

11). Los ovocitos antes del cultivo (recién recogidos) y los tratados con roscovitina no mostraron diferencias en estos dos estadios nucleares. El porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadio de Met I fue superior en el grupo B que en los tres grupos restantes.

TABLA 9. Estadío nuclear de los ovocitos porcinos antes y después de 22h de cultivo en NCSU-37 con (grupo A) o sin suplemento hormonal (grupo B), o con 50µM de roscovitina (grupo ROS).

Estadío Nuclear (%)	Antes cultivo	Grupo A	Grupo B	Grupo ROS	p
N	156	173	164	152	
GV-0	9.6 ± 2.4 a	0.6 ± 0.6 b	0 b	0 b	<0.001
GV-I	60.9 ± 3.9 a	37.0 ± 3.7 b	31.7 ± 3.6 b	63.2 ± 3.9 a	<0.001
GV-II	8.3 ± 2.2 a	37.0 ± 3.7 b	26.2 ± 3.5 b	29.6 ± 3.7 b	<0.001
GV-III	7.0 ± 2.1 a	23.7 ± 3.2 b	20.1 ± 3.1 b	7.2 ± 2.1 a	<0.001
GV-IV	7.0 ± 2.1 a	0 b	3.7 ± 1.5 ab	0 b	<0.001
Metafase I	5.1 ± 1.8 ab	1.2 ± 0.8 a	13.4 ± 2.7 b	0 a	0
Anafase I	0	0	1.2 ± 0.9	0	0.12
Telofase I	0.6 ± 0.6	0	2.4 ± 1.2	0	0.06
Metafase II	1.3 ± 0.9	0.6 ± 0.6	2.4 ± 1.2	0	0.53

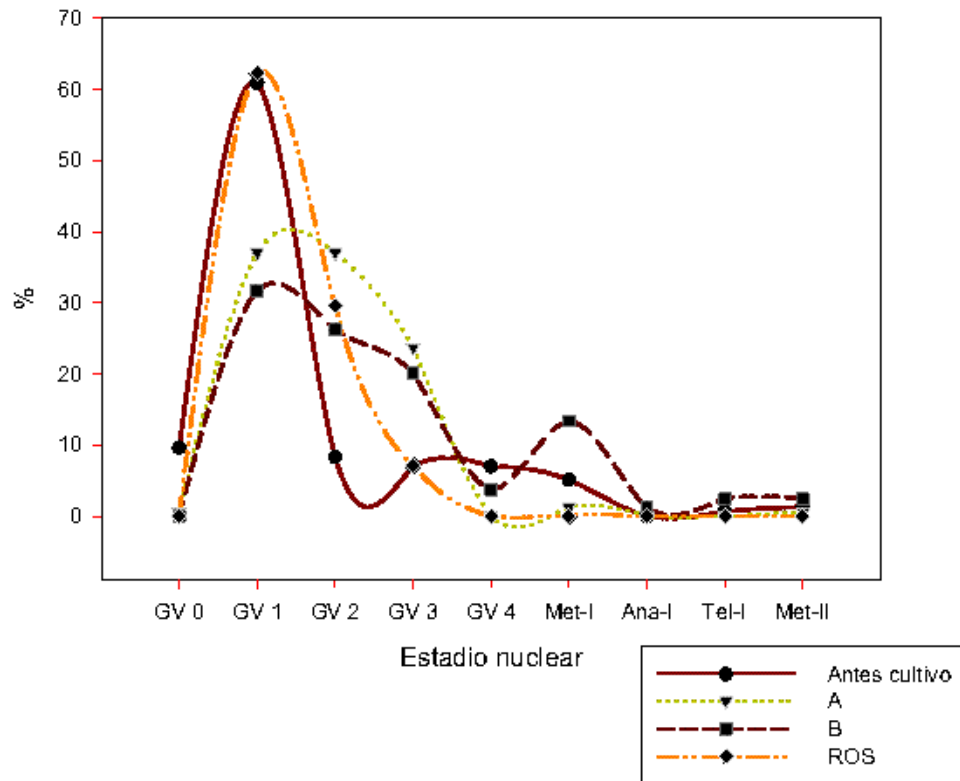
a, b; subíndices diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

A: 22 h de cultivo en NCSU-37 con hCG, eCG, dbAMPc

B: 22 h de cultivo en NCSU-37 sin hCG, eCG, dbAMPc

ROS: 22h de cultivo en NCSU-37 sin hCG, eCG, dbAMPc y con 50 µM de roscovitina

FIGURA 11. Efecto del cultivo en NCSU-37 con o sin suplemento hormonal, o con 50 μ M de roscovitina sobre el estadio nuclear a las 22h.



4.2.2 Progresión nuclear de los ovocitos madurados *in vitro* con premaduración en roscovitina

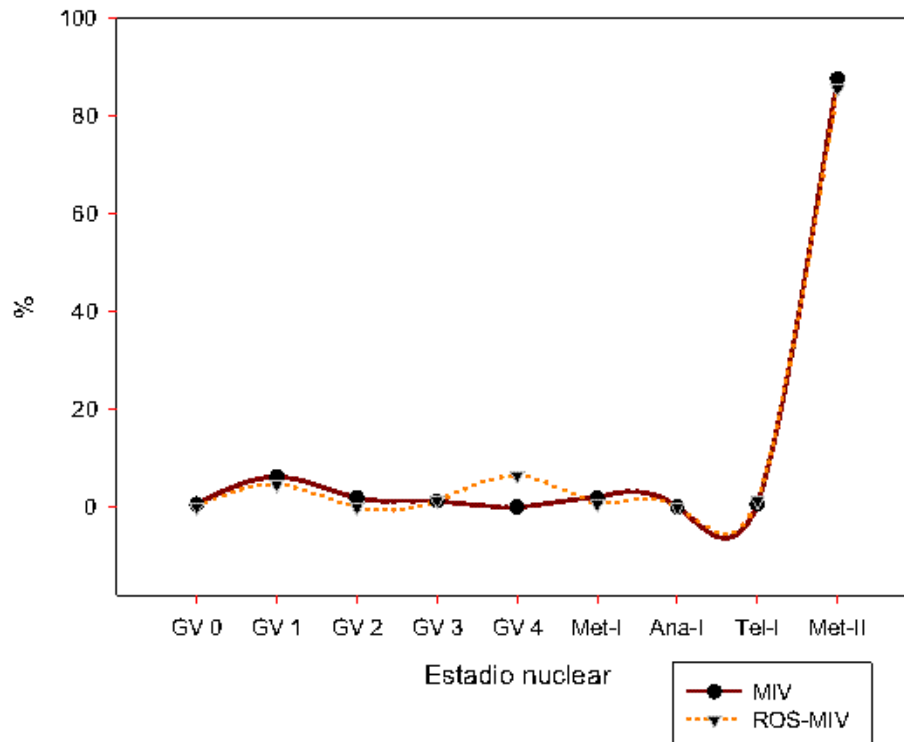
Los resultados muestran que después del período de maduración de 44h, los ovocitos pertenecientes al grupo ROS-MIV reanudan la meiosis y alcanzan el estadio de MII en los mismos niveles que el grupo MIV sin premaduración con roscovitina. Estos porcentajes oscilan alrededor del 85% (tabla 10 y figura 12).

TABLA 10. Estadío nuclear de los ovocitos porcinos después de la maduración *in vitro* con (ROS-MIV) o sin (MIV) un período de premaduración de 22h en 50 μ M de roscovitina.

Estadío Nuclear (%)	Grupo MIV	Grupo ROS-MIV	p
N	161	153	
GV-0	0.6 \pm 0.6	0	0.33
GV-I	6.2 \pm 1.9	4.6 \pm 1.7	0.52
GV-II	1.9 \pm 1.1	0	0.09
GV-III	1.2 \pm 0.9	1.3 \pm 0.9	0.96
GV-IV	0 a	6.5 \pm 2.0 b	<0.001
Metafase I	1.9 \pm 1.1	0.6 \pm 0.6	0.34
Anafase I	0	0	1
Telofase I	0.6 \pm 0.6	1.3 \pm 0.9	0.53
Metafase II	87.6 \pm 2.6	85.6 \pm 2.8	0.61

a, b; subíndices en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

FIGURA 12. Efecto de la maduración *in vitro* con (ROS-MIV) o sin (MIV) un período de premaduración de 22h en 50 μ M de roscovitina sobre el estadio nuclear de los ovocitos porcinos.

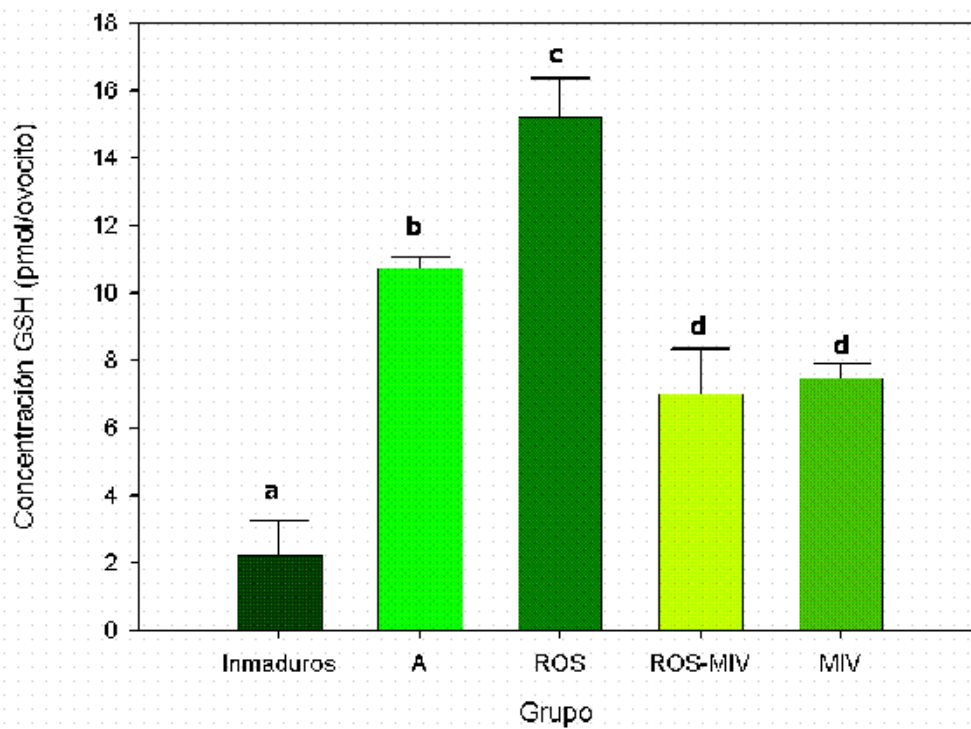


4.2.3. Efecto de la roscovitina sobre el contenido en GSH de los ovocitos

Como se observa en la figura 13, el contenido intracelular de GSH aumentó durante el cultivo de los ovocitos. Cuando se cultivaron durante 22 h, el contenido en GSH aumentó desde los 2.2 pmol/ovocito que se habían detectado en los ovocitos recién recogidos, hasta 10.7 pmol/ovocito, y esta cantidad fue aún mayor cuando el cultivo se realizó en presencia de roscovitina (15.2 pmol/ovocito). Después de la maduración *in vitro*, no se

observaron diferencias independientemente de que se hubieran prematurado con roscovitina durante 22 horas o no, siendo 7.0 y 7.5 pmol/ovocito los valores detectados, respectivamente. Sin embargo, ambos grupos mostraron un menor contenido en GSH que el grupo cultivado en presencia de roscovitina a las 22 horas.

FIGURA 13. Contenido intracelular de GSH en ovocitos porcinos antes del cultivo, después de 22 h de cultivo en NCSU-37 con hCG, eCG y dbAMPc (grupo A); sin hCG, eCG, dbAMPc y con 50 μ M de roscovitina (grupo ROS) y después de una MIV convencional (22 h A + 22 h B) con (ROS-MIV) o sin (grupo MIV) precultivo en roscovitina.



a, b, c, d Diferentes superíndices representan diferencias significativas ($p < 0.001$)

4.2.4. Efecto de la roscovitina sobre la fecundación por ICSI

Los resultados de esta experiencia muestran que para los porcentajes de activación y degeneración, no se observan diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de ovocitos premadurados en presencia del inhibidor (ROS). Los porcentajes de activación oscilan alrededor de un 80% y los de degeneración alrededor de un 18% (tabla 11). Para otras variables analizadas, no se observa efecto significativo, obteniéndose unos porcentajes de 2PN alrededor de un 50%. Se observó un efecto significativo para la variable embriones ya que el grupo ROS presentó mayores porcentajes de embriones que el grupo control (22.22% y 7.14%, $p < 0.05$, para ROS y control, respectivamente).

El porcentaje de la variable otros fue superior para el grupo premadurado con roscovitina (0% vs 7.78% respectivamente) ($p < 0.05$).

TABLA 11. Media y SEM de la media para los distintos parámetros ICSI con premaduración o no en roscovitina y MIV de 44h, en 7 replicados. Evaluación a las 22 hpi.

	Deg (%)	Act (%)	Pre-2PN*	2PN*	Embriones*	Otros*
Control N=115	21.74±3.96	80.46±4.28	34.29±5.7 1	55.71±5.98	7.14±3.10a	0a
ROS N=139	16.55 ± 3.16	81.31±3.79	21.11±4.3 3	48.89±5.30	22.22±4.41b	7.78±2.84b
p	0.2946	0.8818	0.0628	0.3945	0.0090	0.0169

* En base al porcentaje de activados

a, b; subíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

4.2.5 Efecto de la roscovitina sobre el desarrollo embrionario *in vivo*

Como muestran los resultados (tabla 12), los embriones resultantes de la ICSI fueron capaces de iniciar gestaciones cuando fueron transferidos a las hembras receptoras. Un 60% y un 80% de las cerdas transferidas presentaron un retraso del celo mayor de 23 días para el grupo control y roscovitina, respectivamente. Un 20% de las cerdas mostraron un diagnóstico positivo de gestación con presencia de vesículas embrionarias entre los 21-25 días y un 10% tuvieron un aborto visible para ambos grupos.

TABLA 12. Resultados del desarrollo embrionario *in vivo* para ovocitos premadurados o no en ROS y fecundados por ICSI, en 10 replicados.

	N	Retraso celo (>23d)	Vesículas positivas	Abortos visibles
CONTROL	10	6	2	1
ROS	10	8	2	1

4.2.6 Efecto del tiempo de MIV sobre la ICSI de ovocitos porcinos premadurados en roscovitina.

En esta experiencia, se puede observar que no existen diferencias significativas en los porcentajes de activación y degeneración para los distintos grupos de ovocitos premadurados en roscovitina y madurados durante diferentes tiempos y para activación (83.61% vs 81.68 vs 90.0%) y degeneración (19.21% vs 17.61% vs 17.12%) respectivamente (tabla 13).

Sin embargo, se observa un efecto significativo para los porcentajes de Pre-2PN (18.63%; 29.91%; 41.28% $p < 0.05$) y 2PN (73.53%; 61.68%; 55.05 % $p < 0.05$) para 36, 40 y 44h, respectivamente (tabla 13).

TABLA 13. Media y SEM para diferentes parámetros de fecundación por ICSI con diferentes horas de MIV y preincubación en roscovitina, en 7 replicados. Evaluación a las 22 hpi.

Horas MIV	Deg (%)	Act (%)	Pre-2PN* (%)	2PN* (%)	Otros* (%)
36h N= 151	19.21±3.21	83.61±3.36	18.63±3.84 a	73.53±4.39 a	7.84±2.67
40h N= 159	17.61±3.03	81.68±3.39	29.91±4.47 ab	61.68±4.72 ab	8.41±2.69
44h N= 146	17.12±3.12	90.08±2.72	41.28±4.73 b	55.05±4.78 b	3.67±1.39
P	0.887	0.152	0.002	0.019	0.312

* En base al porcentaje de activados

a, b; subíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

4.2.7 Efecto de la premaduración con roscovitina en ovocitos madurados in vitro durante 36h.

Los resultados de esta experiencia no muestran un efecto significativo de la premaduración en roscovitina y posterior MIV de 36h para ninguna de las variables estudiadas. Los porcentajes de activación se encuentran alrededor del 80% tanto para el grupo control como para la roscovitina y los de degeneración oscilan alrededor del 10% para ambos grupos (tabla 14).

Tampoco se observaron diferencias significativas para el resto de variables estudiadas tras la ICSI. Los porcentajes de posibles embriones se encuentran alrededor de un 70% para el grupo control y el grupo roscovitina (72.13% vs 70.67%; tabla 14).

TABLA 14. Media y SEM para diferentes parámetros de ICSI en ovocitos madurados in vitro durante 36h con o sin preincubación en roscovitina, en 4 replicados. Evaluación a las 22 hpi.

36h MIV	Deg (%)	Act (%)	Pre-2PN*	2PN*	Otros*
Control N=90	14.14±3.72	79.22±4.65	13.11±4.35	72.13±5.78	14.75±4.57
ROS N=102	7.84±2.67	79.79±4.16	22.67±4.86	70.67±5.29	6.67±2.90
P	0.928	0.145	0.155	0.852	0.125

* En base al porcentaje de activados

4.3 EFECTO DEL $InsP_3$ SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO.

Como muestra la tabla 15 se encontraron diferencias significativas para la variable división, ya que en los grupos inyectados con espermatozoide independientemente del $InsP_3$ los valores fueron mayores que en los grupos sham. Cabe destacar que los porcentajes de división se encuentran alrededor de un 60% con unos porcentajes de blastocistos muy bajos para ambos grupos. Debido al tamaño muestral del número de blastocistos (8 para grupo control, 3 para grupo $InsP_3$ y 1 para grupo sham- $InsP_3$) no podemos inferir en los resultados.

TABLA 15. Media y SEM para los parámetros de desarrollo embrionario *in vitro* de los ovocitos inyectados con o sin InsP_3 . Porcentaje división evaluado a las 48 hpi y porcentaje blastocistos a los 7 días post- inyección.

Grupo	División (%)	Blastocistos (%)	N céls/blastocisto
Control n=58	68.97±6.12 a	13.79±4.56 a	31.25±5.35
InsP₃ n=54	59.26±6.67 a	5.56±3.14 ab	22.33±7.88
Sham-tampón n=55	10.42±4.44 b	0 b	0
Sham-InsP₃ n=48	20±5.44 c	1.82±1.81 b	21
p	<0.001	0.008	0.610

DISCUSIÓN

5

DISCUSIÓN

En la actualidad, existe un considerable interés por producir grandes cantidades de ovocitos (mediante técnicas de maduración *in vitro*, MIV) y de embriones (mediante fecundación *in vitro*, FIV) en la especie porcina con el propósito de avanzar en la investigación básica y biomédica. Debido a su similitud biológica con el hombre, el cerdo ha llegado a ser cada vez más importante como potencial donador de órganos para xenotrasplantes y como animal transgénico para producir proteínas específicas. Los intentos para donar y producir cerdos transgénicos mediante inyección pronuclear requieren ovocitos maduros y cigotos, respectivamente. Sin embargo, la obtención quirúrgica de ovocitos y embriones a partir de animales donantes es costosa económicamente, necesita una gran inversión de tiempo y la cantidad de material biológico obtenida es escasa. Por este motivo, la utilización eficaz de ovarios procedentes de matadero para producir ovocitos maduros y embriones mediante técnicas *in vitro* es crucial (Abeydeera, 2002).

El objetivo general de este estudio fue, como ya se ha indicado, aumentar el rendimiento de la producción *in vitro* de embriones porcinos, que con la metodología actualmente utilizada apenas llega a un 15%. Para conseguirlo, nuestro primer paso consistió en buscar en las fuentes bibliográficas las posibles causas de este bajo rendimiento e intentar solventarlas. Entre los factores que afectan al proceso, nos encontramos básicamente con las complicaciones asociadas a la maduración *in vitro* de los ovocitos, a la polispermia y a las inadecuadas condiciones de cultivo embrionario. Mediante la introducción de la técnica de ICSI, el inconveniente de la polispermia queda solucionado, ya que un único espermatozoide se introduce en el interior del ovocito. Sin embargo, el

porcentaje de blastocistos que se obtienen tras el cultivo de los cigotos, ya de por sí bajo mediante la FIV tradicional, se ve drásticamente disminuido después de la ICSI. Las razones para explicar este fracaso pueden encontrarse, al menos parcialmente, en la propia técnica de ICSI, y en este caso los problemas inherentes a esta metodología no pueden ser evitados en su totalidad (daños en la membrana plasmática del ovocito, disrupción del sistema microtubular por el efecto mecánico de la inyección, etc...). Sin embargo, sí podemos trabajar sobre las causas relacionadas con el propio ovocito, con el espermatozoide o con el cigoto. En relación al factor espermático, durante la técnica de la ICSI se introduce el espermatozoide en el ovocito con la totalidad de sus membranas, a diferencia de lo que ocurre durante la fecundación fisiológica. Este factor ya fue estudiado con anterioridad en nuestro laboratorio, utilizando espermatozoides frescos frente a congelados tratados bajo diferentes condiciones, observándose diferencias principalmente en cuanto al verraco utilizado y en cuanto al método de conservación empleado. Si embargo, el porcentaje de blastocistos aumentó únicamente para uno de los verracos utilizados (García-Roselló, 2003). Por este motivo, en el presente trabajo decidimos centrarnos en el ovocito y en el cigoto como objetos de estudio, tratando de aumentar su capacidad o competencia de desarrollo. Para ello, intentamos en primer lugar optimizar la secuencia de utilización de los medios de fecundación *in vitro* y de cultivo de embriones (FIV y CE) que emplean la mayoría de los laboratorios que trabajan en esta especie. En segundo lugar, intentamos mejorar el sistema de maduración *in vitro* del ovocito mediante la introducción de inhibidores de la meiosis, como es el caso de la roscovitina, y valoramos el desarrollo embrionario *in vivo* de los cigotos obtenidos por ICSI bajo estas condiciones. Dentro de este mismo apartado, estudiamos el tiempo óptimo de maduración *in vitro*, tomando tres tiempos de MIV comúnmente utilizados (36, 40 y 44h). Por último, para verificar si el problema estaba en la necesidad del cigoto de ser estimulado en el momento de la ICSI para favorecer las oscilaciones de calcio, se estudió el efecto del InsP_3 sobre el desarrollo embrionario *in vitro*.

5.1 EFECTO DEL TIEMPO DE CULTIVO EN MEDIO TALP SOBRE LOS PARÁMETROS DE ICSI Y DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO*.

En los últimos años, con el auge experimentado por las técnicas de clonación, se ha vuelto a poner de manifiesto la ineficacia de los medios de

cultivo *in vitro* para el desarrollo de los cigotos de la mayoría de las especies de mamíferos. Por este motivo, numerosos grupos han trabajado en la identificación de los factores presentes en los medios de cultivo que tienen un efecto beneficioso o nocivo sobre la activación del genoma embrionario, la capacidad de división de los blastómeros, la eclosión del blastocisto, etc. Entre otras conclusiones, junto al ya conocido efecto bifásico del suero, inhibiendo las primeras divisiones, pero estimulando la compactación de la mórula y la formación del blastocisto (Lim *et al.*, 1994), se ha observado que este aditivo, tan comúnmente empleado como fuente proteica, reduce la criotolerancia de los blastocistos y altera los patrones de expresión de ARNm (Rizos *et al.*, 2002). Por otra parte, cuanto más se ha profundizado en el conocimiento de los microambientes oviductal y uterino, en los que los cigotos experimentan sus primeras divisiones *in vivo* hasta que alcanzan el estadio de blastocisto y eclosionan, más parece existir un acuerdo común en la necesidad del uso de medios secuenciales, en los que los componentes van cambiando al mismo tiempo que lo hacen los requerimientos del embrión en desarrollo. Por citar un ejemplo, se han diseñado medios de cultivo en diferentes especies que suprimen la glucosa durante el periodo de pre-compactación y la añaden durante el periodo post-compactación, basándose en el hecho de que la producción de ATP en las primeras etapas de desarrollo es muy baja y de que concentraciones altas de glucosa en estos estadios pueden resultar tóxicas para el embrión (Jiménez *et al.*, 2003).

En la especie porcina, el medio NCSU-23 (Petters y Reeds, 1991) es el más ampliamente utilizado para el cultivo de embriones. En nuestro estudio, se empleó con todas las modificaciones que se han ido incorporando sucesivamente según se ha ido avanzando en el conocimiento de las necesidades del embrión. Así, contiene albúmina libre de ácidos grasos pero no suero, insulina como factor de crecimiento, aminoácidos esenciales y no esenciales, y glucosa, entre otras sustancias. Para conseguir mejorar el porcentaje de blastocistos obtenidos *in vitro* tras el cultivo de los cigotos producidos por ICSI, nos planteamos diseñar un experimento en el que pudiéramos comprobar si la transferencia directa de los cigotos a este medio de cultivo, que ha sido empleada por diversos investigadores (Kim *et al.*, 1998; Kolbe y Holtz., 1999; Lai *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1998, 2003), podría ser una de las causas del bajo rendimiento final obtenido. Según nuestra hipótesis, el hecho de que la técnica de ICSI suprima pasos de la fecundación relativos al reconocimiento entre los gametos, la unión

espermatozoide-zona pelúcida, la inducción de la reacción acrosómica o la fusión con el oolema, no significa que un cigoto recién inyectado se encuentre ya en estadio pronuclear o que sus requerimientos de cultivo equivalgan a los de un embrión en estadio de dos células. Por ello, decidimos comparar el efecto de las horas de cultivo en medio TALP, antes de la transferencia a medio NCSU-23, sobre los resultados de desarrollo embrionario. En el medio TALP se produce la formación pronuclear en los sistemas de fecundación tradicional (Coy *et al.*, 2002, Matás *et al.*, 2003) y tras un periodo de tiempo variable entre 6 y 20 horas, los cigotos se transfieren a medio NCSU. Sin embargo, en nuestra revisión de la bibliografía no encontramos referencias que estudiaran la secuencia idónea de tiempo de cultivo entre el medio TALP y el NCSU de los ovocitos porcinos recién inyectados, aunque existen datos que indican que la formación pronuclear tiene lugar durante las seis primeras horas tras la inyección del espermatozoide (Lee *et al.*, 2002).

Según nuestra hipótesis, puesto que durante las seis primeras horas tras la inyección espermática tiene lugar la formación pronuclear, la presencia de los cigotos en este medio de FIV rico en calcio, lactato y piruvato, podría favorecer este evento y por lo tanto el desarrollo embrionario posterior. Además, también podría resultar beneficioso mantener a los cigotos en este medio durante un periodo más largo (20h), dando tiempo a que se produzcan las primeras divisiones embrionarias como ocurre en el oviducto, antes de transferirlos al medio NCSU-23.

Los resultados obtenidos confirmaron parcialmente nuestra hipótesis, ya que aquellos cigotos que estuvieron durante 6 ó 20 horas en medio TALP alcanzaron el estadio de dos células más rápidamente que los que se transfirieron directamente a medio NCSU-23. El hecho de que a las 22 horas postinyección ya comenzaran a observarse las primeras divisiones en los cigotos que habían sido cultivados en TALP nos indica que posiblemente la viabilidad de estos embriones sea mayor, a pesar de que en los porcentajes de blastocistos, valorados a los 7 días, las diferencias encontradas no resultaran significativas. Como ha sido previamente demostrado, el momento en el que ocurre la primera división es un importante indicador de la capacidad de desarrollo ulterior (Lonergan *et al.*, 1999). Una explicación alternativa sería la que se ha postulado en relación a que el desarrollo perimplantacional de los embriones macho es más rápido que el de los embriones hembra cuando la glucosa está presente en el

medio (Larson *et al.* 2001), como es nuestro caso. Sin embargo, bajo las condiciones de nuestro estudio, esta posibilidad no explicaría las diferencias encontradas, ya que la concentración de glucosa en el TALP y en el NCSU-23 fue la misma.

En cuanto al resto de los parámetros evaluados, en los que no se observaron diferencias entre los tres grupos experimentales empleados, nos resultan útiles para valorar la bondad de nuestra metodología. Así, la activación ovocitaria, que fue superior al 83% en todos los casos, se sitúa en valores comparables a los obtenidos por Katayama *et al.* (2002) cuando cultivaron los ovocitos recién inyectados en un medio de FIV (TCM199) o por Lee *et al.* (2003), cuando emplearon el NCSU-23. Del mismo modo, nuestros resultados de formación pronuclear a las 22 h o de división a las 48h post-inyección, son similares a los obtenidos por otros autores (Lai *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 1998; Probst y Rath, 2003).

En resumen, los resultados de este primer experimento confirmaron nuestra hipótesis de que es beneficioso cultivar los ovocitos inyectados en medio de FIV antes de pasarlos a un medio de cultivo de embriones, aunque no se encontraron diferencias entre el empleo de 6 ó 20 horas. Pensamos que la mayor presencia del calcio necesario para la formación de los pronúcleos en el medio TALP puede ser una de las razones de estos resultados. Otros estudios también obtienen mejores porcentajes de blastocistos y número de células por blastocisto con piruvato y lactato durante los dos primeros días de cultivo embrionario en medio PZM y NCSU37 (Kikuchi *et al.*, 2002; Yoshioka *et al.*, 2002). De este modo, el mayor porcentaje de embriones de dos células obtenidos con el grupo TALP también puede deberse a la presencia en este medio (a pesar de no ser un medio exclusivo de cultivo embrionario) de piruvato y lactato.

Sin embargo, debido a que los porcentajes de blastocistos que obtuvimos no superaron los valores del 15% reportados por otros autores, decidimos continuar nuestro trabajo investigando en la línea de la segunda hipótesis planteada. Esta segunda hipótesis fue diseñada para introducir cambios en el sistema de maduración *in vitro*, y de esta manera intentar incrementar la maduración citoplasmática, por una parte mediante el uso de inhibidores meióticos, y por otra mediante cambios en la duración de MIV.

5.2 EFECTO DE LA ROSCOVITINA SOBRE LA MADURACIÓN *IN VITRO*, ICSI Y DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VIVO*.

Diversos autores que han empleado la técnica de ICSI en la especie porcina han sugerido que la inadecuada maduración citoplasmática del ovocito puede ser la causa del bajo desarrollo embrionario posterior (Kolbe y Holth, 1999; Probst y Rath, 2003). Para solventar estos problemas asociados a la maduración *in vitro* y más concretamente a la maduración citoplasmática, se han estado empleando diversos inhibidores que mantienen al ovocito en estadio de GV. De esta manera se intenta mimetizar las condiciones internas del folículo *in vivo* y se pretende incrementar el período de maduración citoplasmática. La roscovitina (Meijer *et al.*, 1997) es un potente inhibidor de factor promotor de la maduración (MPF) y se ha visto que puede inhibir un menor número de kinasas que la 6-DAMP pero con una mayor especificidad por su competencia con el sitio de unión al ATP de la cdc2. Además, es uno de los inhibidores que menos efectos perjudiciales han mostrado hasta el momento, y existen referencias de un posible efecto beneficioso del precultivo en presencia de este inhibidor (Coy *et al.*, 2003; Marchal *et al.*, 2001; Mermillod *et al.*, 2000). Sin embargo, los resultados deben interpretarse con precaución debido a que se ha demostrado que la roscovitina inhibe en parte la síntesis de ARN (Ljungman y Paulsen, 2001), no previene la mayoría de las modificaciones en los patrones de fosforilación de proteínas observados durante la maduración, (Vigneron *et al.*, 2004a) y algunas rutas implicadas en la regulación de la maduración de ovocitos bovinos parecen ser independientes de la actividad del MPF y de la reanudación de la meiosis (Vigneron *et al.*, 2004b).

Como primer paso de esta segunda experiencia, estudiamos el efecto inhibidor de la roscovitina sobre el estadio nuclear de los ovocitos a las 22 horas del cultivo y sobre los ovocitos después de la maduración *in vitro*. A continuación, estudiamos su efecto sobre la maduración citoplasmática, valorando el contenido intracelular de GSH y la formación del pronúcleo masculino tras la ICSI. Finalmente, los cigotos inyectados se transfirieron directamente al oviducto de cerdas receptoras con el fin de permitir su desarrollo en condiciones *in vivo*, dados los resultados obtenidos en la experiencia anterior con el cultivo *in vitro*.

En nuestro estudio, una concentración de 50 μ M durante 22h de cultivo fue suficiente para inhibir la rotura de la vesícula germinal en porcentajes superiores al 90%, siendo los resultados para GV-I y GV-III similares en los ovocitos recién recogidos y en aquellos cultivados con roscovitina. Por el contrario, al emplear el medio de MIV sin roscovitina, los ovocitos comenzaron espontáneamente a reanudar la meiosis. Además, cuando empleamos el medio NCSU37 sin dbAMPc, la progresión hasta estadios avanzados de GV-IV fue más rápida debido a la ausencia de efecto de este otro inhibidor (Funahashi *et al.*, 1997a). De esta manera, se demuestra que la progresión de los ovocitos porcinos hasta GV-III en presencia de 50 μ M de roscovitina se encuentra diferentemente inhibida que en presencia del dbAMPc o en ausencia de inhibidores, ya que los ovocitos cultivados con roscovitina permanecen en estadios nucleares similares a los de los ovocitos recién obtenidos por sección del folículo.

El efecto de la roscovitina como inhibidor de la reanudación de la meiosis ha sido previamente demostrado en cerdos. Ju *et al.* en 2003 encontraron que concentraciones de roscovitina de 80-120 μ M eran necesarias para inhibir la rotura de la vesícula germinal en el 83-91% de los casos. Sin embargo, en este trabajo se valoró el estadio nuclear de los ovocitos a las 44h del comienzo del cultivo en roscovitina, y posiblemente pensamos que la actividad del inhibidor podría haber disminuido en el medio debido al largo período de tiempo del cultivo. De hecho, la roscovitina tiene un período de vida en sangre de aproximadamente 24h (Meijer y Raymond, 2003). Igualmente, Mc. Clue *et al.* (2002) observaron que la roscovitina presenta un efecto máximo entre las 8 y 24 horas de cultivo.

El efecto reversible de la roscovitina en el núcleo se corrobora en nuestro estudio observando los elevados porcentajes de ovocitos en estadio de MII alcanzados después de 22h de cultivo en presencia de roscovitina y posterior cultivo de 44h en el sistema tradicional de MIV. Resultados similares fueron obtenidos por Mermillod *et al.* (2000) en vacas, que demostraron que utilizando roscovitina a concentraciones de 25 μ M se bloqueaba eficientemente la reanudación de la meiosis durante 24h de cultivo. Este efecto inhibitor fue completamente reversible ya que el 89% de los ovocitos tratados con ROS y cultivados posteriormente en ausencia de inhibidor durante las siguientes 24h alcanzaron el estadio de MII.

Aunque la reversibilidad del efecto de la ROS se ha demostrado en nuestro estudio mediante la obtención de gran porcentaje de ovocitos en MII, no podemos deducir con estos datos si realmente la maduración citoplasmática se ha incrementado o no. Está bien documentado que no existe siempre correlación directa entre la maduración nuclear y la citoplasmática (Coy *et al.*, 1999). La reanudación de la meiosis tras el cultivo en ausencia de roscovitina, presumiblemente reinicia la activación del MPF, pero no es un prerrequisito que nos asegure una correcta maduración citoplasmática. En cambio, el contenido de GSH intracelular y la capacidad del ovocito para descondensar la cabeza del espermatozoide y formar el pronúcleo masculino (PNM), son parámetros comúnmente aceptados para valorar la maduración citoplasmática en ovocitos porcinos (Coy *et al.*, 1999; Funahashi *et al.*, 1995; Sawai *et al.*, 1997).

El GSH depende de la cantidad de cisteína disponible para el ovocito (Meister y Tate, 1976). Esta cisteína se añade como sustrato para la síntesis de GSH de forma rutinaria en los medios de maduración de ovocitos porcinos (Yoshida *et al.*, 1993). Las concentraciones utilizadas comúnmente son de 0.57mM, y esta es la concentración utilizada en nuestro medio de maduración NCSU-37. En nuestro estudio, las concentraciones de GSH en los ovocitos recién recogidos del ovario fueron más bajas que en los ovocitos cultivados durante 22 o 44h en los medios de MIV, y los valores obtenidos en este último caso fueron similares a los obtenidos por Brad *et al.*, (2003). Esto nos indica que nuestro sistema de MIV fue efectivo en la síntesis de GSH por parte del ovocito.

A diferencia de lo obtenido por Yoshida *et al.*, (1993) el contenido en GSH de nuestros ovocitos fue superior a las 22h de cultivo que a las 44h. Estos autores observaron un incremento continuo de GSH durante el proceso de maduración. Pensamos que estas diferencias con respecto a nuestro sistema pueden ser debidas al medio de MIV utilizado; mientras que en nuestro estudio utilizamos el NCSU-37, Yoshida *et al.*, utilizan el medio TCM199, un medio rico en precursores de GSH (cisteína, cistina, ácido glutámico, glutamina y glicina) e incluso GSH. El NCSU-37 únicamente se suplementa con cisteína y glutamina, y se ha demostrado que la cisteína es auto-oxidada a cistina durante la primera hora de maduración (de Matos y Furnus, 2000), por lo que no puede incorporarse tan fácilmente como la cisteína (Yoshida y Takahashi, 1998).

Por otra parte, se ha estudiado que la síntesis de GSH durante fases tempranas y medias de la maduración de los ovocitos porcinos se lleva a cabo para que el ovocito adquiera la habilidad para descondensar el núcleo espermático (Yoshida, 1993) y la síntesis de GSH durante fases iniciales de maduración en hámster es responsable de los elevados niveles obtenidos en ovocitos maduros (Perreault *et al.*, 1988). De estas observaciones podemos deducir que existe una elevada síntesis de GSH durante las primeras etapas de la maduración y estaría en acuerdo con nuestros resultados donde observamos un pico de GSH después de las 22h del cultivo.

Los resultados obtenidos en esta experiencia parecen indicar un efecto del precultivo en presencia de roscovitina sobre el contenido en GSH. Los ovocitos precultivados en presencia del inhibidor durante 22h muestran niveles más elevados de GSH que los cultivados con dbAMPc durante el mismo período de tiempo. Esta sea posiblemente la primera referencia que relacione el contenido intracelular de GSH en los ovocitos con la utilización de un inhibidor como la roscovitina. Una explicación a estas diferencias podría encontrarse en la cooperación metabólica en el interior del complejo *cumulus*-ovocito. La captación de cisteína se ve interrumpida durante la pérdida de contacto entre el ovocito y las células del *cumulus*, es decir, durante la pérdida de las uniones tipo *gap* en el proceso de maduración (Yoshida y Takahashi, 1998), por lo que la síntesis de GSH cesa debido a esta falta de contacto celular (de Matos *et al.*, 1998). Durante la premaduración en roscovitina, no se observa expansión de las células del *cumulus*, a diferencia de los ovocitos tratados con dbAMPc (Marchal *et al.*, 2001; Coy *et al.*, 2004; Schoevers *et al.*, 2004). Este mayor tiempo de contacto entre las células del *cumulus* y el ovocito durante la premaduración en presencia de roscovitina podría explicarnos el mayor nivel de GSH obtenido en estos ovocitos.

En cuanto a los resultados evaluados tras la fecundación mediante ICSI, la formación pronuclear no se vio afectada por la premaduración en presencia de roscovitina al igual que el resto de parámetros valorados. Estos resultados eran de esperar debido a los niveles similares de GSH obtenidos en los distintos grupos tras la MIV. Además, está ampliamente estudiado que la formación del PNM está muy relacionada con el contenido intracelular de GSH (Yoshida *et al.*, 1992; Funahashi *et al.*, 1995). Los porcentajes de activación y de posibles embriones fueron semejantes a los obtenidos por otros autores sin el uso de la roscovitina (Kim *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003). No se ha encontrado ninguna referencia en cerdos del uso

de ovocitos premadurados en presencia de roscovitina y posteriormente fecundados por ICSI. Únicamente, recientemente en la especie equina se ha realizado un trabajo de ICSI con ovocitos premadurados en roscovitina (Franz *et al.*, 2003). Estos autores demuestran que la roscovitina es capaz de aumentar la capacidad de desarrollo cuando se utilizan ovocitos con *cumulus compacto*, obteniendo mayores porcentajes de división que sin el uso de la misma. En nuestro trabajo, también se demostró que la roscovitina afectaba a la velocidad de división de los cigotos, valorada a las 22 hpi, ya que el grupo de ovocitos madurados tras el precultivo en roscovitina presentó mayores porcentajes de embriones de dos células que el grupo control. Al igual que en la experiencia anterior, estos resultados también confirmaron parcialmente nuestra hipótesis de partida, ya que, como hemos mencionado, el momento en el que ocurre la primera división es un importante indicador de la capacidad de desarrollo ulterior del embrión (Lonergan *et al.*, 1999). Sin embargo, en la especie bovina, este efecto de la roscovitina no ha podido ser demostrado (Mermillod *et al.*, 2000).

Para corroborar la posible mayor viabilidad de los embriones obtenidos a partir de ovocitos precultivados con roscovitina antes de la maduración, decidimos ubicarlos en el medio más fisiológico posible, transfiriéndolos al oviducto de cerdas receptoras tras la microinyección. Los resultados derivados de esta experiencia *in vivo* muestran que los embriones resultantes de la fecundación por ICSI y premadurados en presencia de ROS son capaces de iniciar gestaciones cuando se transfieren a las hembras receptoras, pero no son capaces de llegar a término. Los mismos resultados se observaron para el grupo control. Si tenemos en cuenta los estudios realizados en porcino mediante MIV-ICSI y transferencia de embriones (Kolbe y Holtz, 2000; Lai *et al.*, 2001; Martin, 2000; Nakai *et al.*, 2003; Probst y Rath, 2003), el número de lechones obtenidos es muy bajo. Únicamente un grupo de investigación ha logrado 3 lechones mediante la utilización de ovocitos madurados *in vitro* (Nakai *et al.*, 2003), y parece que el porcentaje de éxito aumenta mediante el uso de ovocitos madurados *in vivo* (Probst y Rath, 2003) con 6 a 7 lechones por camada.

Por lo tanto, pese al posible efecto beneficioso de la roscovitina sobre las primeras etapas de desarrollo embrionario, los cigotos producidos por ICSI difícilmente se desarrollan a término incluso en las mejores condiciones de cultivo (en el interior del oviducto porcino).

Con el empleo de la FIV tradicional, se sabe que sólo de un 20 a 30% de los embriones transferidos sobreviven a pesar de las mejoras de las técnicas de producción de embriones porcinos (Abeydeera, 2002) y únicamente alrededor de 6 lechones se obtienen por hembra transferida (Abeydeera *et al.*, 1998). Con el fin de demostrar que la roscovitina no era nociva para el desarrollo embrionario y se podía obtener descendencia viva a partir de ovocitos precultivados con este inhibidor, realizamos un estudio paralelo en nuestro laboratorio, no incluido en esta Tesis, mediante FIV tradicional. En él obtuvimos 10 y 12 lechones, respectivamente, de dos cerdas que quedaron gestantes tras la transferencia de cigotos, tanto en el grupo control como en el grupo en el que se empleó la roscovitina, siendo el primer caso en el que se ha obtenido descendencia viva en la especie porcina a partir de ovocitos madurados *in vitro* en presencia de este inhibidor (Coy *et al.*, 2004, 2005).

A nivel práctico, de las observaciones anteriores podemos deducir que se pueden emplear ovocitos premadurados en roscovitina obteniendo resultados similares a los observados sin el empleo de este inhibidor. La viabilidad de cultivar ovocitos porcinos bajo condiciones de inhibición meiótica con el uso de roscovitina, sin disminuir la capacidad de desarrollo, permite flexibilidad para ajustar el protocolo de trabajo en experimentos complejos. De esta manera, sería de gran utilidad en aquellos laboratorios donde no se disponga de un matadero cercano para la recogida de los ovarios, o en aquellos casos donde nos interese estudiar a nivel molecular los acontecimientos que ocurren durante el estadio de la GV, período como hemos comentado en el apartado de la revisión bibliográfica, de gran importancia en el desarrollo ovocitario.

Utilizando esta estrategia (mantener a los ovocitos recogidos de matadero en presencia de roscovitina durante unas horas, para ajustar nuestro protocolo de trabajo), decidimos estudiar el efecto de las horas de maduración *in vitro* sobre el rendimiento de la ICSI. Se sabe que la edad de los ovocitos es un factor crítico, y ovocitos demasiado viejos presentan su capacidad de desarrollo limitada. Además, se sabe que en estos ovocitos viejos existe poca cantidad de MPF implicado en la fosforilación de una proteína p220 que se une a la tubulina y afecta a la formación de los microtúbulos. De esta manera, los ovocitos viejos presentan mayor grado de fragmentación que el resto de ovocitos (Kikuchi, 2000). Creímos oportuno el realizar esta experiencia ya que no existen referencias en la

especie porcina que comparen el efecto del tiempo de MIV en los resultados de fecundación por ICSI.

Utilizamos tres tiempos de maduración que se han estado empleando en la MIV porcina; 36h (Yoshida *et al.*, 1993; Ka *et al.*, 1997), 40h (Galeati *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1997) y 44h (Galeati *et al.*, 1991; Coy *et al.*, 2003). El precultivo en roscovitina, como hemos indicado, nos permitió ajustar el horario de inyección. Ya habíamos demostrado en la experiencia anterior que los ovocitos premadurados en roscovitina y sometidos a 44h de MIV alcanzaban el estadio de 2 células tras la fecundación antes que los ovocitos control. En esta ocasión, pretendíamos averiguar, tras el precultivo en roscovitina, si el tiempo de MIV podría acortarse para mejorar el desarrollo embrionario post-ICSI.

Los resultados confirmaron esta hipótesis, ya que al reducir el tiempo de maduración, el porcentaje de cigotos con dos pronúcleos que obtuvimos aumentó significativamente. En los ovocitos madurados durante 40 ó 44 horas, el desarrollo fue más lento, y la formación del pronúcleo masculino tras la ICSI se vio retrasada con respecto a los ovocitos madurados 36h. En la bibliografía consultada, este estudio no ha sido realizado, y los tiempos de MIV para la ICSI han variado de 42 a 50h (Kim *et al.*, 1998; Lai *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003). No obstante, los porcentajes de cigotos viables en todos los estudios no han alcanzado los niveles que presentamos en este trabajo (73.5%). Pensamos que gran parte de estas diferencias son debidas al uso de diferentes tratamientos exógenos para activar a los ovocitos, así como la calidad de los ovocitos empleados y al sistema de MIV. El material que utilizamos de partida en nuestro estudio proviene de hembras híbridas comerciales de 85-95kg de peso (8-9 meses de edad) muy próximas a la pubertad. Además, el matadero se encuentra a una hora de nuestro laboratorio de manera que los ovarios llegan en buenas condiciones. La sección de los folículos se realiza mediante bisturí. Se sabe que el método de recogida de los ovocitos afecta al desarrollo posterior. Liu y Moor en 1997 obtuvieron mayores porcentajes de maduración nuclear y divisiones en ovocitos procedentes de folículos diseccionados con bisturí frente a los ovocitos obtenidos mediante aspiración del folículo. En nuestro estudio, únicamente se seccionan con el bisturí los mejores folículos de manera que en este nivel ya estamos seleccionando gran parte de los ovocitos. Una segunda selección más exhaustiva se realiza bajo el estereomicroscopio, donde únicamente se recogen los ovocitos con citoplasma granular y

homogéneo rodeados por varias capas de células de *cumulus*. Este factor también es de gran importancia en los sistemas de producción de embriones porcinos (Coy y Romar, 2002).

Otro factor crucial, como hemos comprobado, puede ser la edad de los ovocitos empleados. Los ovocitos más viejos tienen menor capacidad de ser fecundados que los ovocitos jóvenes, debido a la menor cantidad de quinasa H1 (Stumpf *et al.*, 1994) y a la menor cantidad de la forma activada del MPF (Kikuchi *et al.*, 2000). Funahashi *et al.* en 1997 demostraron que alrededor del 47% de los ovocitos alcanzaban la MII a las 36 horas de MIV por lo que la gran mayoría de los ovocitos eran viejos a la hora de la fecundación *in vitro*.

Por otra parte, existen referencias en la especie bovina (Marchal *et al.*, 2001; Mermillod *et al.*, 2000) que demuestran que después del cultivo en roscovitina, el tiempo necesario para alcanzar la MII se acorta, aunque este hecho no se ha demostrado en la especie porcina. Para verificar que las diferencias observadas en nuestro estudio no tenían relación con el precultivo con roscovitina, diseñamos un experimento adicional en el que los ovocitos fueron madurados durante 36h con o sin premaduración en presencia del inhibidor.

Como muestran los resultados, no se observaron diferencias significativas para ninguna de las variables analizadas y de nuevo el porcentaje de posibles cigotos viables alcanzó el 70%. Esto nos indica, que si bien cuando el período de MIV es de 44h se afecta el desarrollo embrionario temprano por el uso previo o no de un inhibidor como la roscovitina, en el caso de períodos de maduración más cortos, como 36h, esto no ocurre, situándose los valores de cigotos con 2PN, en niveles muy elevados, superiores a los obtenidos por la mayoría de los grupos tras la ICSI porcina.

Tras analizar estos resultados, nos quedaba por investigar la posibilidad de que los fallos en el desarrollo embrionario post-ICSI estuvieran relacionados con una inadecuada activación durante el proceso de microinyección, como han sugerido otros equipos de investigación (Lai *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003; Nakai *et al.*, 2003; Probst *et al.*, 2003).

5.3 EFECTO DEL InsP_3 SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO*.

Con los resultados de ICSI obtenidos a lo largo de las experiencias anteriores, podemos afirmar que no es necesaria la activación del ovocito tras la inyección del espermatozoide, ya que los valores obtenidos son similares o incluso superiores a otros autores que utilizan pulsos eléctricos, tratamiento de los ovocitos con ionóforo de calcio, inyección de calcio o etanol. Simplemente con el estímulo del espermatozoide es suficiente para activar al ovocito y que se inicie el desarrollo embrionario. Sin embargo, al ser tan bajo el número de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto (aunque no inferior al resto de autores), nos planteamos la posibilidad de que la activación producida no fuese la adecuada y que por ello, el ovocito fuera incapaz de desencadenar todas las etapas posteriores que conducen finalmente a la formación del blastocisto.

Entre los mensajeros que participan en la activación ovocitaria se encuentra el inositol 1, 4, 5-trifosfato (InsP_3 ; Wu *et al.*, 2001). El mecanismo de acción de esta molécula consiste en inducir un incremento en la concentración de calcio intracelular al liberarse este ion de su reservorio: el retículo endoplásmico. Aunque el mecanismo por el cual la fusión espermatozoide-ovocito provoca las diferentes oscilaciones de calcio en el ovocito no está dilucidado, sí se ha puesto en evidencia la activación de la vía del fosfoinositol, que conduce a la activación de una isoforma de la fosfolipasa C, la cual media en la hidrólisis del PIP_2 produciendo DAG e InsP_3 , y éste finalmente induce la liberación de calcio del retículo endoplásmico. Miyazaky *et al.* en 1993, demostraron la funcionalidad del InsP_3 durante el proceso de fecundación. Estos autores inyectaron anticuerpos inhibidores de los receptores de InsP_3 y observaron un bloqueo en la liberación del calcio.

En principio pensamos que la liberación de calcio provocada como consecuencia de la inyección del espermatozoide no era similar, en el ritmo y en la intensidad, a la que se produce como consecuencia de la fusión del espermatozoide a las envolturas del ovocito, ya que aunque hubiera activación, el desarrollo embrionario posterior era deficiente, aunque similar al de otros autores. Por ello, decidimos continuar con nuestra tercera hipótesis, intentando mejorar la activación ovocitaria mediante la inyección del espermatozoide junto con InsP_3 , molécula intracelular que

fisiológicamente media en el proceso necesario para la liberación de calcio. *In vitro*, Amano *et al.* (2004) utilizaron esta molécula como activador partenogenético en la especie porcina. Demostraron que la inyección de InsP_3 en el ovocito promueve la activación, la división e incluso el desarrollo embrionario hasta blastocisto y que esta capacidad podría estar relacionada positivamente con el incremento de Ca^{+2} inducido por el InsP_3 .

Los resultados que obtuvimos, valorados como proporción de blastocistos, no mostraron, en contra de lo esperado, ninguna mejoría tras la inyección del InsP_3 junto con los espermatozoides con respecto a los observados para el grupo control (espermatozoides inyectados sin InsP_3). Hasta el momento no hemos encontrado en la bibliografía investigadores que utilicen el InsP_3 junto con el espermatozoide para intentar optimizar el rendimiento de la ICSI en la especie porcina. Sin embargo, en el ratón, Kurokawa y Fissore (2003) han demostrado que la fecundación mediante ICSI modifica el inicio de las oscilaciones de calcio y provoca una menor persistencia y duración de estas oscilaciones que la FIV tradicional, relacionando este hecho con la menor capacidad de desarrollo embrionario de los cigotos producidos por ICSI. Los resultados obtenidos podrían ser explicados, como han propuesto Banrezes *et al.* (2004), porque no hemos imitado adecuadamente la dinámica del calcio en el ovocito tras la fecundación, que consiste en una serie de funciones de activación e inhibición secuenciales. Estos autores consiguieron descendencia viva en ratones (67%) después de someter a los ovocitos fecundados a 24 pulsos eléctricos cada 8 minutos durante tres horas, que se correspondieron con 24 oscilaciones de calcio causadas por la liberación de calcio intracelular. Quizá en nuestro caso, si se hubiera introducido el InsP_3 en el ovocito o en el medio de cultivo secuencialmente, habríamos observado alguna mejora. No obstante no podemos interpretar categóricamente estos resultados, debido al escaso número de blastocistos obtenidos en esta experiencia. Lai *et al.* en 2001 obtienen unos porcentajes de blastocistos del 30%, pero en este caso se emplearon ovocitos activados artificialmente mediante pulsos eléctricos, y cuando se eliminó esta activación, lo cual podría ser comparable a nuestro grupo control, el porcentaje de blastocistos disminuyó hasta el 4.6%, algo similar a lo obtenido en nuestra experiencia.

El porcentaje de división también presentó rangos similares cuando los espermatozoides se inyectaron en el ovocito, independientemente de la presencia o ausencia de InsP_3 . Sin embargo, cuando inyectamos la solución

tampón en el ovocito o el InsP_3 sin espermatozoides, sí encontramos diferencias, lo que demuestra la activación del ovocito como consecuencia del InsP_3 . En todos los caso estos porcentajes son inferiores a los que obtienen Amano *et al.* (2004) cuando utilizan altas concentraciones de InsP_3 (78.1%). La diferencia podría estribar en la concentración de InsP_3 ya que nosotros siempre trabajamos con una concentración menor de $500\mu\text{M}$. En cualquier caso, en nuestro experimento, el efecto del espermatozoide sobre la división fue superior al provocado por el InsP_3 . Por tanto estos resultados indican que el estímulo del espermatozoide en la especie porcina es suficiente para obtener niveles de división comparables con aquellos grupos que utilizan agentes activantes. No obstante, en algún paso entre la inyección del espermatozoide y la puesta en marcha de los mecanismos correctos que llevarán al cigoto a formar un blastocisto, hay un vacío que hasta el momento ninguna investigación ha sido capaz de llenar.

INVESTIGACIÓN FUTURA

INVESTIGACIÓN FUTURA

NOVEDADES METODOLÓGICAS

- Es el primer estudio en el que se compara una secuencia de empleo de dos medios de cultivo post-ICSI para identificar su efecto en el rendimiento final de la técnica.
- Otra novedad es la utilización de un sistema de maduración *in vitro* en dos pasos, el primero en presencia de un inhibidor meiótico, en el que se mide el contenido intracelular de glutatión y se comparan parámetros de fecundación por ICSI en ovocitos porcinos premadurados.
- Es el primer estudio en la especie porcina en el que se inyecta InsP_3 conjuntamente con el espermatozoide.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS

Las líneas de investigación deberían encaminarse a la mejora en los medios de cultivo embrionario ya sea mediante cocultivos celulares (células oviductales y endometriales) o mediante variaciones en su composición. Un aspecto importante que podría estudiarse es el efecto de las oviductinas en el ovocito y posterior desarrollo embrionario.

Sería también de interés evaluar el efecto de diferentes concentraciones de InsP_3 en diferentes tiempos y analizar las oscilaciones de calcio mediante mediciones del calcio intracelular. Se podrían comparar estos patrones con los patrones de FIV e intentar explicar el escaso desarrollo de los ovocitos inyectados.

Por último, se podría estudiar el sistema de microtúbulos y microfilamentos tras la ICSI para ver si se altera. Si fuera así, explicaría en parte el bajo desarrollo embrionario que se obtiene actualmente con esta técnica.

CONCLUSIONES

7

CONCLUSIONES

1. Los cigotos porcinos producidos por ICSI alcanzan el estadio de dos células a las 22h en mayor proporción si se cultivan 6 ó 20 horas previamente en medio TALP que si se cultivan directamente en medio NCSU-23.
2. El cultivo de los ovocitos porcinos en presencia de 50µM de roscovitina durante 22h inhibe la meiosis y aumenta el contenido intracelular de glutatión. Este efecto es reversible tras la maduración *in vitro* y produce un aumento en los porcentajes de cigotos que alcanzan el estadio de 2 células tras la ICSI.
3. Los cigotos obtenidos por ICSI son capaces de iniciar gestaciones cuando se transfieren a una hembra receptora, independientemente de si han sido tratados o no con roscovitina.
4. Un período de maduración *in vitro* de 36h incrementa los porcentajes de cigotos en estadio de 2 pronúcleos a las 22h tras la ICSI, independientemente de la premaduración en roscovitina.
5. La inyección conjunta del espermatozoide con inositol trifosfato no incrementa el rendimiento final de la ICSI en la especie porcina.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

BSA: albúmina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin*)

CE: cultivo *in vitro* de embriones

COCs: complejos células del *cumulus oophorus*-ovocito

DAG: diacilglicerol

dbAMPc: dibutilil AMP cíclico

FCS: suero fetal bovino (*Fetal Calf Serum*)

FIV: fecundación *in vitro*

FSH: hormona folículo estimulante

GC: gránulos corticales

GV: vesícula germinal

GVBD: ruptura de la vesícula germinal (*Germinal Vesicle Breakdown*)

hpi: horas post inyección

HCG: gonadotropina coriónica humana (*Human Chorionic Godanotropin*)

ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides (*Intracytoplasmic Sperm Injection*)

InsP₃: inositol 1,4,5 trifosfato

InsP₃-R: receptores del inositol 1,4,5-trifosfato

MI: metafase I

MII: metafase II

MIV: maduración *in vitro*

MPF: factor promotor de la maduración (*Maturation Promoting Factor*)

N céls/blastocisto: número medio de células por blastocisto

NCSU: medio *North Carolina State University*

PBS: tampón fosfato salino de Dulbecco modificado (*Phosphate Buffer Saline*)

PFF: fluido folicular porcino (*Porcine Follicular Fluid*)

PIP₂: fosfoinositol bifosfato

PKC: proteínquinasa C

PMSG: gonadotropina sérica de yegua gestante (*Pregnant Mare Serum Gonadotropin*)

PNM: pronúcleo masculino

PVP: polivinilpirrolidona

TALP: medio de Tyrodes con albúmina, lactato y piruvato (*Tyrodes Albumin Lactate Pyruvate*)

TCM199: medio de cultivo 199 (*Tissue Culture Medium-199*)

ZP: zona pelúcida

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abeydeera LR, Day BN. Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biol Reprod* **1997**; 57:729-734.
- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather RS, Day BN. Presence of beta-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Theriogenology* **1998**; 50:747-756.
- Abeydeera LR. *In vitro* production of embryos in swine. *Theriogenology* **2002**; 57:256-273.
- Amano T, Mori T, Watanabe T. Activation and development of porcine oocytes matured *in vitro* following injection of inositol 1,4,5-trisphosphate. *Anim Reprod Sci* **2004**; 80:101-112.
- Anderson E, Albertini DF. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J Cell Biol* **1976**; 71:680-686.
- Austin CR. Observations on the penetrations of the sperm into the mammalian egg. *Aus J Sci Res* **1951**; 4:581-596.
- Avery B, Greve T. Development of *in vitro* fertilised bovine embryos exposed to 6-dimethylaminopurine prior to *in vitro* maturation. *Theriogenology* **1997**; 47:314.
- Bachvarova R. Gene expression during oogenesis and oocyte development in mammals. *Dev Biol* **1985**; 1:453-524.
- Banrezes B, Toth S, Huneau D, Schultz R, Ozil JP. A method to drive calcium signalling dynamics in fertilized mouse eggs. *Reprod Fert Dev* **2004**; 16 (1,2):268.
- Barends PM, Stroband HW, Taverne N, Kronnie G, Leen MP, Blommers PC. Integrity of the preimplantation pig blastocyst during expansion and loss of polar trophoderm (Raubert cells) and the morphology of the embryoblast as an indicator for developmental stage. *J Reprod Fertil* **1989**; 87:715-726.
- Bazer FW, Geisert RD, Thatcher WW and Roberts RM. The establishment and maintenance of pregnancy. In *Control of Pig Reproduction* **1982**; pp 227-252 Eds DJA Cole and GR Foxcroft. Butterworth Scientific, London.
- Benoff, S. Carbohydrates and fertilization: an overview. *Mol Hum Reprod* **1997**; 3:599-637.

- Ben-Yosef D, Shalgi R. Oocyte activation: lessons from human infertility. *Trends Mol Med* **2001**; 7:163-169.
- Besenfelder U, Müller M y Brem G. Transgenics and modern reproductive technologies. En: Rothschild MF y Ruvinsky A (Eds). *The genetics of the pig*. CAB International **1998**; 345-374.
- Braw-Tal R. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? *Mol Cell Endocrinol* **2002**; 187:11-18.
- Breitbart H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol Cell Endocrinol* **2002**; 22; 187:139-144.
- Brison DR, Schultz RM. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol Reprod* **1997**; 56:1088-1096.
- Brower PT, Gizang E, Boreen SM, Schultz RM. Biochemical studies of mammalian oogenesis: synthesis and stability of various classes of RNA during growth of the mouse oocyte *in vitro*. *Dev Biol* **1981**; 86:373-383.
- Brun B. Studies on fertilization in *Xenopus laevis*. *Biol. Reprod.* **1974**; 11: 513-518.
- Cameron RDA, Durack M, Fogarty R, Putra DKH y McVeigh J. Practical experience with commercial embryo transfer in pigs. *Aust Vet J* **1990**; 66:314-318.
- Canipari R. Cell-cell interactions and oocyte growth. *Zygote* **1994**; 2:343-345.
- Carbonneau G, Sirard MA. Influence of follicular wall on meiotic resumption of bovine oocytes when cultured inside or outside hemisection. *J Reprod Dev* **1994**; 40:120-132.
- Catt JW, Rhodes SL. Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic species. *Reprod Fertil Dev* **1995**; 7:161-166.
- Catt JW. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and related technology. *Anim Reprod Science* **1996**, 42: 239-250.
- Catt JW, O'Brien JK y Evans G. Microinjection of sperm into porcine oocytes: does an influx of calcium promote fertilization events?. *J Repro Fert* **1997**; 19:50 (Abstract).
- Chang MC. Fertilizability of rabbit ova and the effects of temperature *in vitro* on their subsequent fertilization and activation *in vivo*. *J Exp Zool* **1952**; 121:351-381.
- Chen WY, Yang JG, Li PS. Effect of dexamethasone on the expression of p34(cdc2) and cyclin B1 in pig oocytes *in vitro*. *Mol Reprod Dev* **2000**, 56:74-79.
- Cohen J, Alikani M, Trowbridge J, Rosenwaks Z. Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Hum Reprod* **1992**; 7:685-691.
- Coskum S, Lin YC. Site of action of epidermal growth factor (EGF) on *in vitro* porcine oocyte maturation in chemically defined medium. *Biol Reprod* **1992**; 46:138 (Abstract).
- Coy P, Martinez E, Ruiz S, Vázquez JM, Roca J, Matás C. Sperm concentration influences fertilization and male pronuclear formation *in vitro* in pigs. *Theriogenology* **1993a**; 40:539-546.

- Coy P, Martínez E, Ruiz S, Vázquez JM, Roca J, Matás C, Pellicer MT. *In vitro* fertilization of pig oocytes alter different coincubation intervals. *Theriogenology* **1993b**; 39:1201-1208.
- Coy P, Martínez E, Ruiz S, Vázquez JM, Roca J, Gadea J. Environment and medium volume influence *in vitro* fertilisation of pig oocytes. *Zygote* **1993c**; 1:209-213.
- Coy P, Ruiz s, Ouhibi n, Funahashi h, Day BN, Moor RM. Factors affecting nuclear and cytoplasmic maturation in pig oocytes. *Bio Reprod* **1996**; 54:159 (abstract).
- Coy P, Ruiz S, Romar R, Campos I, Gadea J. Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different systems. *Theriogenology* **1999**; 51:799-812.
- Coy P, Romar R, Ruiz S, Gadea J, Matás C, Sellés E. The effect of *in vitro* fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening, and *in vitro* development in the pig. *Reproduction* **2002**; 124: 278-288.
- Coy P, Romar R. In vitro production of pig embryos. A point of view. *Reprod Fert Dev* **2002**; 14:275-286.
- Coy P, Canovas S, García E, Ruiz S, Gadea J, Matás C, Romar R. Effect of roscovitine, a cyclin-dependent kinases inhibitor, on pig *in vitro* maturation and fertilization by ICSI. *Human Reprod* **2003**; 18:37 (abstract).
- Coy P, Cánovas S, Ruiz S, Matás C, Gadea J, García E, Sansegundo M, García F, Gumbao D, Romar R. First pregnancies after transferring of *in vitro* produced pig embryos pre-cultured with roscovitine. *Human Reprod* **2004**; 19:41-42 (abstract).
- Coy P, Romar R, Ruiz S, Canovas S, Gadea J, García FA, Matás C. Birth of piglets after transferring of *in vitro* produced embryos pre-cultured with roscovitine. *Reproduction* **2005**. En prensa.
- Christmann L, Jung T, Moor RM. MPF components and meiotic competence in growing pig oocytes. *Mol Reprod Dev* **1994**; 38:85-90.
- Cran DG, Cheng WTK. The cortical reaction in pig oocytes during *in vivo* and *in vitro* fertilization. *Gamete Res* **1986**; 13:241-251.
- Cuaniscú PS, Ellerman DA, Cohen DJ, Busso D, Morgenfeld MM, Da Ros VG. Molecular mechanisms involved in mamalian gamete fusion. *Arch Med Res* **2001**; 32:614-618.
- Daen FP, Sato E, Naito K, Toyoda Y. The effect of pig follicular fluid fractions on cumulus expansion and male pronucleus formation in porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J Reprod Fert* **1994**; 101:667-673.
- Daguet MC. In vivo change in the germinal vesicle of the sow oocyte during the follicular phase before the ovulatory LH surge. *Reprod Nutr Dev* **1980**; 20:673-680.
- Dantzer V. Electron microscopy of the initial stages of placentation in the pig. *Anat Embryol* **1985**; 172:281-293.
- Davis DL. Culture and storage of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl* **1985**; 33:115-124.
- Dekel N, Kraizer PF. Induction *in vitro* of mucification of rat cumulus oophorus by gonadotropins and adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* **1978**; 67:1420-1425.

- Dekel, N. Meiotic cell cycle, oocytes. In: Encyclopedia of Reproduction. Ed: E. Knobil and JD Neill. Academic Press, San Diego, USA, **1999**; Vol 3: 168-176.
- Di Berardino D, Gil MA, Parilla I, Fernandez MA, Coppola G, Mazza MR, Roca J, Vazquez JM, Lucas X, Martinez EA. Pronuclear Formation and embryo development in pig oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* **2000**; 389 (Abstract).
- Ding J, Moor RM, Foxcroft GR. Effects of protein synthesis on maturation, sperm penetration, and pronuclear development in porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* **1992**; 33:59-66.
- Dobrinsky JR, Johnson LA, Rath D. Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. *Biol Reprod* **1996**; 55:1069-1074.
- Dozortsev D, Rybouchkin A, De Sutter P. Sperm plasma membrane damage prior to intracytoplasmic sperm injection: a necessary condition for sperm nucleus decondensation. *Human Reprod* **1995b**; 10: 2960-2964.
- Driancourt MA, Thuel B. Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. *Reprod Nutr Dev* **1998**; 38:345-362.
- Dziuk P. Effect of migration, distribution and spacing of pig embryos on pregnancy and fetal survival *Journal of Reproduction and Fertility* **1985**; 33: 57-63.
- Ehrenwald E, Foote RH, Parks JE. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol Reprod Dev* **1990**; 25:195-204.
- Ellicot AR, Dziuk PJ, Polge C (1973) Maintenance of pregnancy in prepubertal gilts *Journal of Animal Science* **1973**; 37:971-973.
- Eng LA, Komegay ET, Huntington J, Wellman T. Effects of incubation temperature and bicarbonate on maturation of pig oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil* **1986**; 76:657-662.
- Eppig JJ. Gonadotropin stimulation of the expansion of cumulus oophori isolated from mice: general conditions for expansion *in vitro*. *J Exp Zool* **1979**; 208:111-120.
- Eppig J. oocyte control of ovarian follicular development and fuction in mammals. *Reproduction* **2001**; 122:829-838.
- Eppig JJ, Downs SM. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biol Reprod* **1984**; 30:1-11
- Espey LL. Ovulation. In: Encyclopedia of Reproduction. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic press, San Diego, USA, **1999**; 3: 605-614.
- Exley GE, Carol MW. Zygotic Genomic Activation. In: Encyclopedia of Reproduction. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA, **1999**; 4: 1041-1046.
- Fan HY, Tong C, Lian L, Li SW, Gao WX, Cheng Y, Chen DY, Schatten H, Sun QY. Characterization of ribosomal S6 protein kinase p90^{rsk} during meiotic maturation and fertilization in pig oocytes: mitogen-activated protein kinase-associated activation and localization. *Biol Reprod* **2003**; 68:968-977.
- Flint APF. An unifying hypothesis for the control of blastocyst growth based on observations on the pig. *J Reprod Fert* **1981**; 29:215-227.

- Flowers WL, Esbenshade KL. Optimizing management of natural and artificial matings in swine. *J Reprod Fertil Suppl* **1993**; 48:217-228.
- Foulady Nashta AA, Waddington D, Campbell KHS. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development *in vitro*: a comparative evaluation of antral follicle culture with other methods. *Mol Reprod Dev* **1998**; 59:256-262.
- Frank M, Bazer FW, Thatcher WW, Wilcox CJ. A study of prostaglandin F₂alpha as the luteolysin in swine: III effects of estradiol valerate on prostaglandin F, progestins, estrone and estradiol concentrations in the utero-ovarian vein of nonpregnant gilts. *Prostaglandins* **1977**; 14:1183-1196.
- Freitag M, Dopke HH, Niemman H, Elsaesser F. Ontogeny of RNA synthesis in preimplantation pig embryos and the effect of antioestrogen on blastocyst formation *in vitro*. *J Reprod Fert* **1988**; 1:11 (abstract).
- Fukui Y, Glew AM, Gandolfi F, Moor RM. *In vitro* culture of sheep oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* **1988**; 29:883-891.
- Fulka J Jr, Motlik J, Fulka J, Crozet N. Activity of maturation promoting factor in mammalian oocytes after its dilution by single and multiple fusions. *Dev Biol* **1986**; 118:176-181.
- Fulka J Jr, First NL, Moor RM. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol Hum Reprod* **1998**; 4:41-49.
- Funahashi H, Day BN. Effects of follicular fluid at fertilization *in vitro* on sperm penetration in pig oocytes. *J Reprod Fertil* **1993**; 99:97-103.
- Funahashi H, Cantley TC, Day BN. Different hormonal requirements of pig oocyte-cumulus complexes during maturation *in vitro*. *J Reprod Fert* **1994a**; 101:159-165.
- Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terlouw SL, Day BN. 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. *Biol Reprod* **1994b**; 51:633-639.
- Funahashi H, Cantley TC, Day BN. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyl cyclic AMP improves developmental competence following *in vitro* fertilization. *Biol Reprod* **1997a**; 57:49-53.
- Funahashi H, Day BN. Advances in *in vitro* production of pig embryos. *J Reprod Fert* **1997b**; 52:271-283.
- Funahashi H, Nagai T. Regulation of *in vitro* penetration of frozen-thawed boar spermatozoa by caffeine and adenosine. *Mol Reprod Dev* **2001**; 58:424-431.
- Funahashi, H. Polyspermic penetration in porcine IVM-IVF systems. *Reprod Fertil Dev*. **2003**;15:167-77.
- Gaddum-Rosse P. Mammalian gamete interactions: what can be gained from observations on living eggs? *Am J Anat* **1985**; 174:347-356.
- Galeati G, Modina S, Lauria A, Mattioli M. Follicle somatic cells influence pig oocyte penetrability and cortical granule distribution. *Mol Reprod Dev* **1991**; 29:40-46.

- Gandolfi F, Moor RM. Stimulation of early embryonic development in the sheep by coculture with oviduct epithelial cells. *J Reprod fert* **1987**; 81:23-28.
- García E, Coy P, Matás C, Gadea J, Ruiz S, Romar R. Intracytoplasmic sperm injection of porcine oocytes with two different *in vitro* capacitation systems *Theriogenology* **2003**; 59:315 (abstract).
- García-Roselló E. Efecto del tratamiento espermático sobre el rendimiento de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en la especie porcina. Tesis de Licenciatura **2003**. Universidad de Murcia.
- Gardner DK, Lane M, Spitzer A, Batt PA. 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 acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol Reprod* **1994**; 50:390-400.
- Geisert RD, Zavy MT, Moffatt RJ, Blair RM, Yellin T. Embryonic steroids and the establishment of pregnancy in pigs. *J Reprod Fertil Suppl* **1990**;40:293-305.
- Geisert RD. Pigs. In: Encyclopedia of Reproduction. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA, **1999**; 3:792-799.
- Gilula NB, Epstein ML, Beers WH. Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *J Cell Biol* **1978**; 78:58-75.
- Goto K, Kinoshita, Takuma, Ogawa K. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. *Vet Record* **1990**; 127: 517-520.
- Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* **1996**; 17:121-155.
- Green DPL. Three dimensional structure of the zona pellucida. *Rev Reprod* **1997**; 2:147-156.
- Grimes RW, Ireland JJ. Relationship of macroscopic appearance of the surface of bovine ovarian follicles concentrations of steroids in follicular fluid, and maturation of oocytes *in vitro*. *Biol Reprod* **1986**; 35:725-732.
- Grondahl C, Hansen TH, Hossaini A, Heinze I, Greve T, Hyttel P. Intracytoplasmic sperm injection of *in vitro*-matured equine oocytes. *Biol Reprod* **1997**; 57:1495-1501.
- Guerin P, Guillaud J, Menezo Y. Hypotaurine in spermatozoa and genital secretions and its production by oviduct epithelial cells *in vitro*. *Hum Reprod* **1995**; 10:866-872.
- Hafez ESE. Fecundación y segmentación. En Hafez ESE (ed.), reproducción e inseminación artificial en animales, 7ª ed. México: Interamericana.MC Graw-Hill **2000**; 8:113-127.
- Hajdu MA, Knight JW, Canseco RS, Krisher RL, Velander WH, Pearson RE, Gwazdauskas FC. Effect of culture conditions, donor age, and injection site on *in vitro* development of DNA microinjected porcine zygotes. *J Anim Sci* **1994**; 72:1299-1305.
- Harper MJK. Gamete and Zygote transport. En: Knobbil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven press; **1988**:103-126.
- Hazeleger W, Bouwman EG, Noordhuizen JPTM, Kemp B. Effect of superovulation induction on embryonic development on Day 5 and subsequent development and survival after nonsurgical embryo transfer. *Theriogenology* **2000**; 53:1063-1070.

- Hedrick JL, Wardrip NJ, Berger T. Differences in the macromolecular composition of the zona pellucida isolated from pig oocytes, eggs, and zygotes. *J Exp Zool* **1987**; 241:257-262.
- Heinlein UAO, Wallat S, Senftleben A, Lemaire L. Male germ cell-expressed mouse gene TAZ83 encodes a putative, cysteine-rich transmembrane protein (cyritestin) sharing homologies with snake toxins and sperm-egg fusion proteins. *Dev Growth Diff* **1994**; 36: 49-55.
- Hendriksen PJM, Vos PLAM, Steenweg WNM, Bevers MM, Dieleman SJ. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. *Theriogenology* **2000**; 53:11-20.
- Hiramoto Y. Microinjection of the live spermatozoa into sea urchin eggs. *Exp. Cell Res.* **1962**, 27: 416-426.
- Hlinka D, Herman M, Vesela J, Hredzak R, Horvath S, Pacin J. A modified method of intracytoplasmic sperm injection without the use of polyvinylpyrrolidone. *Hum Reprod* **1998**; 13:1922-1927.
- Holm P, Callesen H. *In vivo* versus *in vitro* produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod Nutr Dev* **1998**; 38:579-594.
- Hunter MG. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction* **2000**; 5:122-130.
- Hunter RHF. Porcine ovulation after injection of human chorionic gonadotrophin. *Vet Rec* **1967**; 81:21-23.
- Hunter RHF. Chronological and cytological details of fertilization and early embryonic development in the domestic pig. *Sus scrofa*. *Anat Rec* **1974**; 178:169-186.
- Hunter RHF. Técnicas para la maduración *in vitro* de gametos, la fecundación *in vitro*, el cultivo de embriones y el almacenamiento a largo plazo. En: Hunter RHF (ed), *Fisiología y tecnología de la reproducción de la hembra de los animales domésticos*, 1ª ed. Acribia, España, **1982**, pp 215-241.
- Hunter RHF. The fallopian tube. Their role in fertility. Berlin: Springer-verlag; **1988**.
- Hunter RHF. Ovarian programming of gamete progression and maturation in the female genital tract. *Zoological Journal of the Linnean Society* **1989**; 95:117-124.
- Hunter RHF. Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Mol Reprod Dev* **1991**; 29:385-391.
- Hunter RHF. Polyspermy. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA, **1999**; 3: 930-937.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* **1997**; 47:23-32.
- Inoue M, Naito K, Aoki F, Toyoda Y, Sato E. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote* **1995**; 3:265-271.
- Iritani A, Hosoi Y, Torii R. Application of ICSI in domestic and/or zoo animals. *Gamet Dev Funct, Serozo Symposia* **1998**; 393-404.

- Iwasaki T, Kimura E, Totsukawa K. Studies on a chemically defined medium for *in vitro* culture of *in vitro* matured and fertilized porcine oocytes. *Theriogenology* **1999**; 51:709-720.
- Jewgenow K, Heerdegen B, Müller K. *In vitro* development of individually matured bovine oocytes in relation to follicular wall atresia. *Theriogenology* **1999**; 51:745-756.
- Jimenez A, Madrid-Bury N, Fernandez R, Perez-Gamelo S, Moreira P, Pintado B, de la-Fuente J, Gutierrez-Adan A. Hyperglycemia-induced apoptosis affects sex ratio of bovine and murine preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* **2003**; 65: 180-187.
- Jones KT, Cruftwell C, Parrington J, Swann K. A mammalian sperm cytosolic phospholipase C activity generates inositol trisphosphate and causes Ca²⁺ release in sea urchin egg homogenates. *FEBS Lett.* **1998**; 437:297-300.
- Joris H, Nagy Z, Van De Velde H, De Vos A, Van Steirteghem A. Intracytoplasmic sperm injection: laboratory set-up and injection procedure. *Hum Reprod* **1998**; 1: 76-86.
- Ju JC, Tsay C, Ruan CW. Alterations and reversibility in the chromatin, cytoskeleton and development of pig oocytes treated with roscovitine. *Mol Reprod Dev* **2003**; 64:482-491.
- Ka HH, Sawai K, Wang WH, Im KS, Niwa K. Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated *in vitro*. *Biol Reprod* **1997**; 57:1478-1483.
- Kanayama N, Miyano T, Lee J. Acquisition of meiotic competence in growing pig oocytes correlates with their ability to activate Cdc2 kinase and MAP kinase. *Zygote* **2002**; 10:261-70.
- Kane MT. A review of *in vitro* gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. *Anim Reprod Sci* **2003**; 79:171-190.
- Kasai T, Hoshi K, Yanagimachi R. Effect of sperm immobilisation and demembration on the oocyte activation rate in the mouse. *Zygote* **1999**; 7:187-193.
- Kasinathan P, Knott JG, Spell AR, King TL, Robl JM. Effect of roscovitine delayed maturation on development of nuclear transplant embryos. *Theriogenology* **2001**; 55:1, 273 (Abstract).
- Katayama M, Miyano T, Miyake M, Kato S. Progesterone treatment of boar spermatozoa improves male pronuclear formation after intracytoplasmic sperm injection into porcine oocytes. *Zygote* **2002a**; 10: 95-104.
- Katayama M, Koshida M, Miyake M. Fate of the acrosome in ooplasm in pigs after IVF and ICSI. *Hum Reprod* **2002b**; 17:2657-2664.
- Katska L, Rynska B, Smorag Z. Development competence of bovine IVM/IVF oocytes under different co-culture conditions. *J Anim Feed Sci* **1998**; 7:353-362.
- Katsuragawa H, Kanzaki H, Inoue T, Hirano T, Narukawa S, Watanabe H, Mori T. Endometrial stromal cell decidualization inhibits human chorionic gonadotrophin and human placental lactogen secretion by co-cultured trophoblasts. *Hum Reprod* **1995**; 10:3028-3034.
- Khatir H, Lonergan P, Mermillod P. Kinetics of nuclear maturation and protein profiles of oocytes from prepuberal and adult cattle during *in vitro* maturation. *Theriogenology* **1998**; 50:917-929.

- Kikuchi K, Nagai T, Motlik J, Shioya Y, Izake Y. Effect of follicle cells on *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes. *Theriogenology* **1993**; 39:593-599.
- Kikuchi K, Kashiwazaki N, Noguchi J, Shimada A, Takahashi R, Hirabayashi M, Shino M, Ueda M, Kaneko H. Developmental competence, after transfer to recipients, of porcine oocytes matured, fertilized, and cultured *in vitro*. *Biol Reprod* **1999**; 60:336-340
- Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, Shimada A, Kaneko H, Yamashita M, Aoki F, Tojo H, Toyoda Y. Maturation/M-phase promoting factor: a regulator of aging in porcine oocytes. *Biol Reprod* **2000**; 63:715-722.
- Kikuchi K, Onishi A, Kashiwazaki N, Iwamoto M, Noguchi J, Kaneko H, Akita T, Nagai T. Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified *in vitro* system. *Biol Reprod* **2002**; 66:1033-1041.
- Kim HS, Lee GS, Hyun SH, Lee SH, Nam DH, Jeong YW, Kim S, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. Improved *in vitro* development of porcine embryos with different energy substrates and serum. *Theriogenology* **2004**; 61:1381-1393.
- Kim NH, Lee JW, Jun SH, Lee HT, Chung KS. Fertilization of porcine oocytes following intracytoplasmic spermatozoon or isolated sperm head injection. *Mol Reprod Dev* **1998**; 51:436-444.
- Kim NH, Shin JS, Kim C, Jun SH, Lee HT, Chung KS. Fertilization and *in vitro* development of porcine oocytes following intracytoplasmic injection of round spermatid or round spermatid nuclei. *Theriogenology* **1999**; 51:1441-1449.
- Klocke S. ICSI of *in vivo* and *in vitro* matured porcine oocytes with epididymal spermatozoa and boar spermatozoa flowcytometrically sorted for gender. Thesis, Tierärztl Hochsch Hannover. **1999**.
- Kolbe T, Holtz W. Intracytoplasmic injection (ICSI) of *in vivo* or *in vitro* matured oocytes with fresh ejaculated or frozen-thawed epididymal spermatozoa and additional calcium-ionophore activation in the pig. *Theriogenology* **1999**; 52: 671-682.
- Kolbe T, Holtz W. Birth of a piglet derived from an oocyte fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Anim Reprod Science* **2000**; 64:97-101.
- Koo DB, Kim NH, Lee HT, Chung KS. 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* **1997**; 48:791-802.
- Krischek C, Meinecke B. Roscovitine, a specific inhibitor of cyclin-dependent protein kinases, reversibly inhibits chromatin condensation during *in vitro* maturation of porcine oocytes. *Zygote*. **2001**; 9:309-316.
- Kubelka M, Motlik J, Fulka J, Prochazka R, Rimkevicova Z, Fulka J. Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and P-amino-benzamidine block. *Gamete Res* **1988**; 19:423-431.
- Kubelka M, Motlik J, Schultz RM, Pavlok A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, Without influencing chromosome condensation activity. *Biol Reprod* **2000**; 62:292-302.

- Lacham-Kaplan O, Trounson A. Intracytoplasmic sperm injection in mice: increased fertilization and development to term after induction of the acrosome reaction. *Hum Reprod* **1995**; 10: 2642-2649.
- Lai L, Sun Q, Wu G, Murphy CN, Kuhholzer B, Park KW, Bonk AJ, Day BN, Prather RS. Development of porcine embryos and offspring after intracytoplasmic sperm injection with liposome transfected or non-transfected sperm into *in vitro* matured oocytes. *Zygote* **2001**; 9:339-346.
- Lane M, Gardner DK. Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* **2000**; 62:16-22.
- Larson MA, Kimura K, Kubisch HM, Roberts RM. Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN-tau. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**; 14; 98(17):9677-9682.
- Latham KE, Garrels JI, Chang C, Solter D. Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one- and two-cell stages. *Development* **1991**; 112:921-932.
- Lee J, Miyano T, Dai Y, Wooding P, Yen TJ, Moor RM. Specific regulation of CENP-E and kinetochores during meiosis I/meiosis II transition in pig oocytes. *Mol Reprod Dev* **2000**; 56:51-62.
- Lee JW, Tian XC, Yang X. Failure of male pronucleus formation is the major cause of lack of fertilization and embryo development in pig oocytes subjected to intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod* **2003**; 68:1341-1347.
- Lim JM, Okitsu O, Okuda K, Niwa K. Effects of fetal clan serum in cultura médium on development of bovine oocytes matured and fertilizad *in vitro*. *Theriogenology* **1994**; 41:1091-1098.
- Liu L, Dai Y, Moor RM. Role of secreted proteins and gonadotrophins in promoting full maturation of porcine oocytes *in vitro*. *Mol Reprod Dev* **1997**; 47:191-199.
- Ljungman M, Paulsen MT. The cyclin-dependent Kinase inhibitor roscovitine inhibits RNA synthesis and triggers nuclear accumulation of p53 that is unmodified at Ser15 and Lys382. *Mol Pharmacol* **2001**; 60:785-789.
- Lonergan P, Khatir H, Carolan C, Memillod P. Bovine blastocyst production *in vitro* after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24h. *J Reprod Fert* **1997**; 109:355-365.
- Lonergan P, Khatir H, Piumi F, Rieger D, Humblot P, Boland MP. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex and pregnancy rates following transfer of bovine preimplantation embryos. *J Reprod Fert* **1999**; 117:159-167.
- Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Yang X, Boland M. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. *Mol Reprod Dev* **2000**; 57: 204-209.
- Lorca T, Cruzalegui FH, Fesquet D, Cavadore JC, Mery J, Means A, Doree M. Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* **1993** ; 18; 366(6452):270-273.

- Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De La Sota RL, Thatcher WW. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim Sci* **1992**; 70: 3614-3626.
- Machaty Z, Day BN, Prather RS. Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*. *Biol Reprod* **1998**; 59:461-465.
- McGaughey RW, Montgomery DH, Richter JD. Germinal vesicle configurations and patterns of polypeptide synthesis of porcine oocytes from antral follicles of different size, as related to their competency for spontaneous maturation. *J Exp Zool* **1979**; 209:239-254..
- Marchal R, Vigneron C, Perreau C, Bali-Papp A, Memillod P. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology* **2002**; 57:1623-1632.
- Markert CL. Fertilization of mammalian eggs by sperm injection. *J Exp Zool* **1983**; 228:195-201.
- Markström E, Svensson EC, Shao R, Svanberg B, Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. *Reproduction* **2002**; 123:23-30.
- Martin MJ. Development of *in vivo* matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod* **2000**; 63:109-112.
- Martínez B. Estudio de fecundación *in vitro* en porcino: reducción de lapolispermia y optimización de la producción *in vitro* de embriones. Tesis Doctoral **2002**. Universidad Complutense de Madrid.
- Martínez E, Vázquez JM, Matás C, Roca J, Coy P, Gadea J. Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Theriogenology* **1993**; 40:647-667.
- Martinez EA, Caamano JN, Gil MA, Rieke A, McCauley TC, Cantley TC, Vazquez JM, Roca J, Vazquez JL, Didion BA, Murphy CN, Prather RS, Day BN. Successful nonsurgical deep uterine embryo transfer in pigs. *Theriogenology* **2004**; 61:137-146.
- Masui Y, Market CL. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* **1971**; 177:129-146.
- Matas C, Coy P, Romar R, Marco M, Gadea J, Ruiz S. Effect of sperm preparation method on *in vitro* fertilization in pigs. *Reproduction* **2003**;125:133-141.
- Mattioli M, Galeati G, Seren E. Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. *Gamete Res* **1988**; 20:177-183.
- Mattioli M. Recent acquisitions in pig oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Reprod Dom Anim* **1994**; 29:347-349.
- McClue SJ, Blake D, Clarke R, Cowan A, Cummings L, Fischer PM, MacKenzie M, Melville J, Stewart K, Wang S, Zhelev N, Zheleva D, Lane DP. In vitro and in vivo antitumor properties of the cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine). *Int J Cancer* **2002**; 102:463-468.
- McGaughey RW, Montgomery DH, Richter JD. Germinal vesicle configurations and patterns of polypeptide synthesis of porcine oocytes from antral follicles of different size, as related to their competency for spontaneous maturation. *J Exp Zool* **1979**; 209:239-254.
- McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* **2000**; 21: 200-214.

- McNatty KP, Heath DA, Lundy T, Fidler AE, Quirke L, O'Connell A, Smith P, Groome N, Tisdall DJ. Control of early ovarian follicular development. *J Reprod Fertil Suppl* **1999**; 54:3-16.
- Meijer L, Raymond E. Roscovitine and other purines as kinase inhibitors. From starfish oocytes to clinical trials. *Acc Chem Res* **2003**; 36:417-426.
- Meister A, Anderson ME. Glutathione. *An Rev Bioch* **1983**; 52:711-760.
- Mermillod P, Oussaid B, Cognie Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil Suppl* **1999**; 54:449-60.
- Mermillod P, Tomanek M, Marchal R, Meijer L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. *Mol Reprod Dev* **2000**; 55:89-95.
- Mertineit C, Yoder JA, Taketo T, Laird DW, Trasler JM, Bestor TH. Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development* **1998**; 125:889-897.
- Miller DJ. A sperm's perspective of fertilization. *Proceedings of the American Society of animal Science* **1999**.
- Miyano T, Dai Y, Lee J, Kano K, Moor RM. Degradation of pig cyclin B1 molecules precedes MAP kinase dephosphorylation during fertilisation of the oocytes. *Zygote* **2000**; 8:153-158.
- Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, Honda Y. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺ release channel in Ca²⁺ waves and Ca²⁺ oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol* **1993**; 158:62-78.
- Moor RM, Mattioli M, Ding J, Nagai T. Maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J Reprod fert* **1990**; 40:197-210.
- Moor RM, Dai y, Lee C, Fulka J, Jr. Oocyte maturation and embryonic failure. *Hum Reprod update* **1998**; 3:223-236.
- Moore HDM, Bedford JM. The interaction of mammalian gametes in the female. In: *Mechanism and control of Animal fertilization*. Ed: Hartmann JF. Academic press, New York, USA, **1983**; 453-497.
- Moos J, Visconti PE, Moore GD, Schultz RM, Kopf GS. Potential role of mitogen-activated protein kinase in pronuclear envelope assembly and disassembly following fertilization of mouse eggs. *Biol Reprod* **1995**; 53:692-699.
- Morbeck DE, Esbenshade KL, Flowers WL, Britt JH. Kinetics of follicle growth in the prepurebal gilt. *Biol Reprod* **1992**; 47:485-491.
- Mori T, Amano T, Shimizu H. Roles of gap junctional communication of cumulus cell in cytoplasmic maturation of porcine oocytes cultured *in vitro*. *Biol Reprod* **2000**; 62:913-919.
- Motlik J, Crozet N, Fulka J. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J Reprod Fert* **1984**; 72:323-328.
- Motlik J, Fulka J. Factors affecting meiotic competente in pig oocytes. *Theriogenology* **1986**; 25:87-97.
- Motlik J, Kubelka M. Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. *Mol Reprod Dev* **1990**; 27:366-375.

- Motlik J, Pavlok A, Lapatitis G. Impact of two-step *in vitro* culture systems on developmental potency of oocytes. *Reprod Dom Anim* **2000**; 35:267-271.
- Myles DG, Primakoff P. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol Reprod* **1997**; 56:320-327.
- Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, Honda Y. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺ release channel in Ca²⁺ waves and Ca²⁺ oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol* **1993**; 158:62-78.
- Nagai T, Takahashi T, Masuda H, Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S, Hanada A. In-vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *J Reprod Fertil* **1988**; 84:585-591.
- Nagai T, Moor RM. Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized *in vitro*. *Mol Reprod Dev* **1990**; 26:377-382.
- Nagashima H, Fujimura T, Takahagi Y, Kurome M, Wako N, Ochiai T, Esaki R, Kano K, Saito S, Okabe M, Murakami H. Development of efficient strategies for the production of genetically modified pigs. *Theriogenology* **2003**, 59:95-106.
- Nagy Zp, Liu J, Joris H, Wisanto A, Devroey P, Van Steirteghem AC. The influence of the site of sperm deposition and mode of oolemma breakage at intracytoplasmic sperm injection (ICSI) on fertilization and embryo development rates. IXth World congress on *in vitro* fertilization and alternate assisted reproduction, Vienna. *Journal of Assisted Reprod and genetics* **1995**; 12:6.
- Naito K, Fukuda Y, Toyoda Y. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured *in vitro*. *Gamete Res* **1988**; 21:289-295.
- Nakai M, Kashiwazaki N, Takizawa A, Hayashi Y, Nakatsukasa E, Fuchimoto D, Noguchi J, Kaneko H, Shino M, Kikuchi K. Viable piglets generated from porcine oocytes matured *in vitro* and fertilized by intracytoplasmic sperm head injection. *Biol Reprod* **2003**; 68:1003-1008.
- Nath KA, Enright H, Nutter L, Fischereder M, Zou JN, Hebbel RP. Effect of pyruvate on oxidant injury to isolated and cellular DNA. *Kidney Int* **1994**;45:166-176.
- Niemann H, Illera MJ, Dziuk PJ. Developmental capacity, size and number of nuclei in pig embryos cultured *in vitro*. *Anim Reprod Sci* **1983**; 5:311-322.
- Niemann H, Rath D. Progress in reproductive biotechnology in swine. *Theriogenology* **2001**; 56:1291-1304.
- O'Brien JK, Catt JW, Maxwell WMC, Evans G. Intracytoplasmic injection (ICSI) of *in vitro* matured pig oocytes with unsorted and sex-sorted pig spermatozoa. 13th ICAR Congress. Sydney (Australia) P10-20. **1996**.
- Oktay K, Briggs D, Gosden RG. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab* **1997**; 82:3748-3751.

- O'Neill C. Autocrine mediators are required to act on the embryo by the 2-cell stage to promote normal development and survival of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Biol Reprod* **1998**;58:1303-1309.
- Papaioannou VE, Ebert KM. The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophoctoderm and inner cell mass of the blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Development* **1988**; 102:793-803.
- Parrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK, Lai FA. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* **1996**; 25;379(6563):364-368.
- Parrington J, Jones ML, Tunwell R, Devader C, Katan M, Swann K. Phospholipase C isoforms in mammalian spermatozoa: potential components of the sperm factor that causes Ca²⁺ release in eggs. *Reproduction* **2002**; 123:31-39.
- Perry AC, Wakayama T, Cooke IM, Yanagimachi R. Mammalian oocyte activation by the synergistic action of discrete sperm head components: induction of calcium transients and involvement of proteolysis. *Dev Biol* **2000**; 16;217:386-393.
- Petters RM, Wells KD. Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl* **1993**; 48:61-73.
- Philpott CC, Ringuette MJ, Dean J. Oocyte-specific expression and developmental regulation of ZP3, the sperm receptor of the mouse zona pellucida. *Dev Biol* **1987**; 21:568-575.
- Picton HM, Briggs D, Gosden R. The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol and Cel End* **1998**; 145:27-37.
- Picton HM. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology* **2001**; 55:1193-1210.
- Picton HM, Danfour MA, Harris SE, Chambers EL, Huntriss J. Growth and maturation of oocytes *in vitro*. *Reprod Suppl* **2003**; 61:445-462.
- Polanski Z, Zubiak JZ. Meiosis. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, **1999**; 3:160-167.
- Polge C. Fertilization in the pig and horse. *J Reprod Fertil*. **1978**; 54:461-470.
- Ponderato N, Lagutina I, Crotti G, Turini P, Galli C, Lazzari G. Bovine oocytes treated prior to *in vitro* maturation with a combination of butyrolactone I and roscovitine at low doses maintain a normal developmental capacity. *Mol Reprod Dev* **2001**; 60:579-585.
- Pope CE, Johnson CA, Mcrae MA, Keller GI, Dresser BI. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Anim Reprod Sci* **1998**; 53:221-36.
- Primakoff P, Myles DG. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science* **2002**; 21;296(5576):2183-2185.
- Probst S, Rath D. Piglets are born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with flowcytometrically sorted semen. *Theriogenology* **2003**; 59: 961-973
- Prochazka R, Nagyova E, Brem G, Schellander K, Motlik J. Secretion of cumulus expansion-enabling factor (CEEF) in porcine follicles. *Mol Reprod Dev* **1998**; 49:141-149.
- Rath D, Long CR, Dobrinsky JR, Welch GR, Schreier LL, Johnson LA. *In vitro* production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *J Anim Sci* **1999**; 77:3346-3352.

- Rath D, Niemann H, Tao T. *In vitro* maturation of porcine oocytes in follicular fluid with subsequent effects on fertilization and embryo yield *in vitro*. *Theriogenology* **1995**; 44:529-538.
- Rath D, Niemann H, Torres CRL. *In vitro* development to blastocysts of early porcine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Theriogenology* **1995**; 43:913-926.
- Rath D, Niemann H. *In vitro* fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology* **1997**; 47:785-793.
- Rho GJ, Kawarsky S, Johnson WH, Kochhar K, Betteridge KJ. Sperm and oocyte treatments to improve the formation of male and female pronuclei and subsequent development following intracytoplasmic sperm injection into bovine oocytes. *Biol Reprod* **1998**; 59:918-24.
- Richard FJ, Sirard MA. Effect of follicular cells on oocyte maturation.II. Theca cells inhibition of bovine oocyte maturation *in vitro*. *Biol Reprod* **1996**; 54:22-28.
- Ringuette MJ, Chamberlin ME, Baur AW, Sobieski DA, Dean J. Molecular analysis of cDNA coding for ZP3, a sperm binding protein of the mouse zona pellucida. *Dev Biol* **1988**; 127:287-295.
- Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Perez S, De la Fuente J, Boland MP, Lonergan P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and Messenger RNA expression. *Biology of Reproduction* **2003**; 68: 236-243.
- Rodríguez KF, Farin CE. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reprod Fertil Dev* **2004**;16:55-67.
- Romar R. Efecto de las células oviductales y del *cumulus oophorus* sobre diferentes parámetros biológicos relacionados con la fecundación *in vitro* en la especie porcina. **Tesis Doctoral**. I.S.B.N.: 84-8371-366-7. Universidad de Murcia. Servicio de Publicaciones. D. L. MU-236-2003. **2003**.
- Romar R, Coy P, Campos I, Gadea J, Matas C, Ruiz S. Effect of co-culture of porcine sperm and oocytes with porcine oviductal epithelial cells on *in vitro* fertilization. *Anim Reprod Sci* **2001**; 68:85-98.
- Saeki k, Nagao Y, Kishi M, Nagai M. developmental capacity of bovine oocytes following inhibition of meiotic resumption by cicloheximide or 6-dimethylaminopurine. *Theriogenology* **1997**; 48:1161-1172.
- Sawai F, Funahashi H, Niwa K. Stage-specific requirement of cysteine during *in vitro* maturation of porcine oocytes for glutathione synthesis associated with male pronuclear formation. *Biol Reprod* **1997**; 57:1-6.
- Schatten G. The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Dev Biol* **1994**; 165:299-335.
- Schultz RM. Meiotic maturation on mammalian oocytes. En: wassarman PM (ed.), *Element of mammalian fertilization*. Boston: CRC Press **1991**:77-104.
- Sette C, Bevilacqua A, Geremia R, Rossi P. Involvement of phospholipase Cgamma1 in mouse egg activation induced by a truncated form of the C-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. *J Cell Biol* **1998**; 24:142:1063-1074.

- Shen X, Miyano T, Kato S. *In vivo* and *in vitro* antrum formation of pig ovarian follicles. In: Miyamoto H, Manabe N, editors. Reproductive biology update, Kyoto: shokado Co: **1998**; 73-79.
- Shimada M, Terada T. Phosphatidylinositol 3-kinase in cumulus cells and oocytes is responsible for activation of oocyte mitogen-activated protein kinase during meiotic progression beyond the meiosis I stage in pigs. *Biol Reprod* **2001**; 64:1106-1114.
- Silva CP, Kommineni K, Oldenbourg R, Keefe DJ. The first polar body does not predict accurately the location of the metaphase II meiotic spindle in mammalian oocytes. *Fertil Steril* **1999**; 71:719-721.
- Sinowatz F, Kolle S, Topfer-Petersen E. Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cells Tissues Organs* **2001**; 168:24-35.
- Sirard MA. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* **2001**; 55:1241-1254.
- Sirard MA, Dufort I, Coenen K, Tremblay K, Massicotte L, Robert C. The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. *Reprod Suppl* **2003**; 61:117-129.
- Sirotkin AV, Duksova J, Makarevich AV, Kubek A, Bulla J. Evidence that growth factors IGF-I, IGF-II and EGF can stimulate nuclear maturation of porcine oocytes via intracellular protein kinase A. *Reprod Nutr Dev* **2000**; 40:559-569.
- Soong YK, Wang HS, Cheng SY, Chien HJ. Expression of insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) mRNA in embryos and endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* **1998**; 4:153-157.
- Sousa M, Barros A, Tesarik J. Developmental changes in calcium dynamics, protein kinase C distribution and endoplasmic reticulum organization in human preimplantation embryos. *Mol Hum Reprod* **1996**; 2:967-977.
- Staigmiller RB, Moor RM. Effects of follicle cells on the maturation and development competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Res* **1984**; 9:221-229.
- Stone BA, Seamark RF, Nelly RW, Deam S. Production of steroids and release of prostaglandins by spherical pig blastocysts *in vitro*. *Aust J Biol Sci* **1986**; 39:283-294.
- Stroband HW, Van der Lende T. Embryonic and uterine development during early pregnancy in pigs. *J Reprod Fertil Suppl* **1990**; 40:261-277.
- Stromstedt M, Biyskov AG. Oocyte, Mammalian. In: Encyclopedia of Reproduction. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA, **1999**; 3:468-480
- Sun QY, Lai L, Wu GM, Park KW, Day BN, Prather RS, Schatten H. Microtubule assembly after treatment of pig oocytes with taxol: correlation with chromosomes, gamma-tubulin, and MAP kinase. *Mol Reprod Dev* **2001**; 60:481-490.
- Suzuki F, Yanagimachi R. Changes in the distribution of intramembranous particles and filipin-reactive membrane sterols during *in vitro* capacitation of golden hamster spermatozoa. *Gamete Res* **1989**; 23:335-347.
- Swann K. A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development* **1990**; 110:1295-1302.

- Terada Y, Luetjens CM, Sutovsky P, Schatten G. Atypical decondensation of the sperm nucleus, delayed replication of the male genome, and sex chromosome positioning following intracytoplasmic human sperm injection (ICSI) into golden hamster eggs: does ICSI itself introduce chromosomal anomalies? *Fertil Steril* **2000**; 74:454-460.
- Tesarik J, Sousa M. Key elements of a highly efficient intracytoplasmic sperm injection technique: Ca^{2+} fluyes and oocyte cytoplasm dislocation. *Fert-Steril* **1995**; 64: 770-776.
- Thibault C, Szollosi D, Gerard M. Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dev* **1987**; 27:865-896.
- Thibordeaux JK, Myers MW, Hansel W. The beneficial effect of incubating bovine embryos in groups are due to platelet-derived growth factor. *Theriogenology* **1995**; 43:336(abstract).
- Thompson JG. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos-a decade of achievement. *Animal Reproduction Science* **2000**; 60-61:263-275.
- Töpfer-Petersen E, Petrounkina AM, Ekhlesi-Hundrieser M. Oocyte-sperm interactions. *Anim Reprod Sci* **2000**; 60-61:653-662.
- Uehara T, Yanahimachi R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol. Reprod* **1976**; 15: 467-470.
- Vigeneron C, Perreau C, Dalbiès-Tran R, Joly C, Humblot P, Uzbekova S, Mermillod P Protein synthesis and mRNA storage in cattle oocytes maintained under meiotic block by roscovitine inhibition of MPF activity. *Mol Reprod Dev* **2004a**; 69, 457-466.
- Vigeneron C, Perreau C, Dupont J, Uzbekova S, Prigent C, Mermillod P. Several signaling pathways are involved in the control of cattle oocyte maturation. *Mol Reprod Dev* **2004b**; 69: 466-474.
- Villa- Diaz LG, Miyano T. Activation of p38 MAPK during porcine oocyte maturation. *Biol Reprod* **2004**; 71:691-696.
- Wang WH, Abeydeera LR, Cantley TC, Day BN. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. *J Reprod Fertil* **1997**; 111:101-108.
- Wang WH, Abeydeera LR, Fraser LR, Niwa K. Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and *in vitro* fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J Reprod Fertil* **1995**;104:305-313.
- Wassaman PM. Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem* **1988**; 57: 415-442.
- Wilding M, Fiorentino A, De Simone ML, Infante V, De Matteo L, Marino M, Dale B. Energy substrates, mitochondrial membrane potential and human preimplantation embryo division. *Reprod Biomed Online* **2002**; 5:39-42.
- Williams CJ. Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Hum Reprod Update* **2002**; 8:313-321.
- Wolny YM, Fissore RA, Wu H, Reis MM, Colombero LT, Ergun B, Rosenwaks Z, Palermo GD. Human glucosamine-6-phosphate isomerase, a homologue of hamster oscillin, does not appear to be involved in Ca^{2+} release in mammalian oocytes. *Mol Reprod Dev* **1999**; 62:277-287.

- Wu B, Ignatz G, Currie WB, Yang X. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod* **1997**; 56:253-259.
- Wu J, Carrell DT, Wilcox AL. Development of *in vitro*-matured oocytes from porcine preantral follicles following intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod* **2001**; 65:1579-1585.
- Xu X, Seth PC, Harbinson DS, Foxcroft GR. Semen dilution for assessment of boar ejaculates quality in pig IVM and IVF systems. *Theriogenology* **1996**; 45:1325-1327.
- Yamauchi N, Sasada H, Sugawara S, Nagai T. Effect of culture conditions on artificial activation of porcine oocytes matured *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* **1996**; 8:1153-1156.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*. Ed: Knobil E and Neill JD. Raven Press, New York, USA, **1988**; 135-185.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*. Ed: Knobil E and Neill JD. Raven Press, New York, USA, **1994**; Vol 1:189-317.
- Yanagimachi R. The mammalian oocyte's response to intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Microscopy of Reprod and Dev: A dynamic approach* **1997**; 187-195.
- Yao LJ, Fan HY, Tong C, Chen DY, Schatten H, Sun QY. Polo-like kinase-1 in porcine oocyte meiotic maturation, fertilization and early embryonic mitosis. *Cell Mol Biol* **2003**; 49:399-406.
- Yonemura I, Fujino Y, Irie S, Miura Y. Transcervical transfer of porcine embryos under practical conditions. *J Reprod Dev* **1996**; 42:89-94.
- Yoshida M, Ishigaki Y, Nagai T, Chikyu M, Pursel VG. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol Reprod* **1993**; 49:89-94.
- Yoshida M, Ishizaki Y, Kawagishi H. Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *J Reprod Fertil* **1990**; 88:1-8.
- Yoshida M, Ishizaki Y, Kawagishi H, Bamba K, Kojima Y. Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes *in vitro* and on their subsequent fertilizing and developmental capacity *in vitro*. *J Reprod Fertil* **1992**; 95:481-488.
- Yoshida M, Ishigaki K, Pursel VG. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*. *Mol Reprod Dev* **1992**; 31:68-71.
- Yoshida M. Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Mol Reprod Dev* **1993**; 35:76-81.
- Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IM, Iwamura S. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol Reprod* **2002**; 66:112-119.
- Yurewicz EC, Sacco AG, Subramanian MG. Pathways to immunocontraception: biochemical and immunological properties of glycoprotein antigens of the porcine zona pelucida. *Adv Exp Med Biol* **1986**; 207:407-427.
- Zheng YS, Sirard MA. The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes. *Theriogenology* **1992**; 37:779-7790.



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY
FACULTY OF VETERINARY

**ANALYSIS OF DIFFERENT FACTORS
AFFECTING THE INTRACYTOPLASMIC
SPERM INJECTION (ICSI) YIELD IN PIGS**

DOCTORAL THESIS

Empar García Roselló

Murcia, 2005

MATERIAL AND METHODS

MATERIAL AND METHODS

Unless otherwise indicated, all chemicals and reagents were purchased from Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, Spain).

3.1 WASHING AND GAMETE MANIPULATION MEDIA

3.1.1 TRANSPORT AND WASHING OF OVARIES AND OOCYTES

Media used for ovary transport, washing and oocyte obtention were the following:

- **Saline Solution (SS)**: 0.9% w/v NaCl with 100 mg/l of kanamicine sulphate.

- **Cetrimide Solution** (Hexadecil-trimetilamonie bromure: Cetab) 0.04% (w/v).

Both solutions were prepared with ultrapure water (Mili-RX) and were maintained at room temperature until use.

- **Dulbecco modified Phosphate saline (D-PBS)** (Sigma D-8662) supplemented with 1mg/ml of alcohol polivinil and 0.005mg/l of phenol red as pH indicator. This medium was stored at 4°C until use.

The medium used for matured oocyte washing and during the injection consisted of **supplemented D-PBS** with 10%(v/v) of foetal calf serum(FCS; Biological Industries[®], Haemek, Israel).

3.1.2 DILUTION AND WASHING

The medium used for sperm dilution and washing was the *Beltsville Thawing Solution* (BTS) (Table 1):

TABLE 1. BTS extender for boar sperm (Pursel and Johnson, 1975)

Component	Concentration (mM)
Glucosa	0.0002
Na₂-EDTA.2H₂O	3.36
CO₃HNa	15
Citrate-Na₃.2H₂O	20
ClK	5

For ICSI sperm treatment, the medium used consisted of supplemented D-PBS.

3.2 CULTURE MEDIA AND SUPPLEMENTS

NCSU-37 stock medium. A stock solution was prepared in the laboratory (table 2) with ultrapure water (Milli-Q). Then, it was sterilized by filtration through 0.22 µm filters, and it was stored in sterile conditions at 4°C during two weeks.

For IVM, NCSU-37 stock medium was supplemented with cysteine, β-mercaptoethanol, insuline, dbAMPc, porcine follicular fluid (PFF), PMSG y HCG (Foligón, Chorulón; Intervet International B.V., Boxmeer, Holanda) as described by Funahashi *et al.* (1997) table 3.

TABLE 2. Composition of NCSU-37 stock medium (Peters and Wells, 1993).

Component	Concentration(mM)
NaCl	108.73
NaHCO₃	25.07
KCl	4.78
KH₂PO₄	1.19
MgSO₄•7H₂O	1.19
CaCl₂•2H₂O	1.70
Glucosa	5.55
D-Sorbitol	12.00
Penicillin G sodic	0.18
Streptomycin Sulphate	39.00 UI/ml

TABLE 3. NCSU-37 medium supplements for *in vitro* porcine oocyte maturation (Funahashi *et al.*, 1997a).

Component	Concentration (mM)
Cysteine	0.57 mM
β-mercaptoethanol	50.00 μM
Insuline	5.00 mg/L
DbAMPc	1.00 mM
PFF	10% (v/v)
PMSG	10 UI/ml
HCG	10 UI/ml

TALP medium. Stock solution (table 4) was prepared in the laboratory with ultrapure water. Sterilization was done by filtration and the medium was stored under sterile conditions at 4°C during two weeks.

TABLE 4. Composition of TALP stock medium (Rath *et al.*, 1999).

Component	Concentration(mM)
NaCl	114.06
NaHCO₃	25.07
KCl	3.20
NaH₂PO₄•H₂O	0.35
MgCl₂•6H₂O	0.50
Lactate Ca•5H₂O	8.00
Lactate sodic	10.00
Glucose	5.00
Cafeine	2.00
Kanamycin sulphate	0.17
Phenol red	0.003
PVA	1 mg/ml

For the culture post ICSI, TALP stock medium was supplemented with 3 mg/ml of bovine seric albumin (BSA-FAF) and 0.12 mg/ml of sodic piruvate (Rath *et al.*, 1999). The pH was adjusted to 7.4 in the incubator at 5% of CO₂, 38.5°C and saturate humidity atmosphere for 20h before use.

NCSU-23 medium. Following the protocol of Peters and Wells (1993) the stock solution (Table 5) was prepared with ultrapure water, and it was further filtrated and stored at 4°C during two weeks. At the time of using for EC, NCSU-23 stock was supplemented with 4 mg/ml of BSA-FAF, insuline 0.57mM, β-mercaptoethanol 50μM, 2% v/v BME (Aminoacids solution 50x) and 1% v/v MEM (non-essential amino acid solution 100x). Finally the solution was filtered and kept in the incubator for one day before use.

TABLE 5. Composition of NCSU-23 stock medium (Peters and Wells, 1993).

Component	Concentration (mM)
NaCl	108.73
NaHCO ₃	25.07
KCl	4.78
KH ₂ PO ₄	1.19
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.19
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.70
Glucose	5.55
Taurine	7.00
Hipotaurine	5.00
Penicillin G sodique	0.18
Streptomycin sulphate	39 UI/ml

R-enantiomer of roscovitine (2-[R]-[1-Ethyl-2-hydroxyethylamino]-6-benzylamino-9-isopropylpurine; R-7772) was solubilized in dimethyl sulfoxide before freezing at -20°C as a 10 mM stock.

Inositol 1, 4, 5-trifosfato (InsP₃, Sigma I-7012). InsP₃ was diluted to 0.5µM in a buffer solution (120mM KCl, 20mM HEPES, and pH 7.4) before freezing at -20°C until use (Amano *et al.*, 2003).

3.3 IN VITRO MATURATION (IVM)

The medium used for oocyte maturation was NCSU-37 (Peters and Wells, 1993) supplemented with 0.57 mM cysteine, 1 mM dibutyryl cAMP, 5 µg/ml insulin, 50 µM β-mercaptoethanol, 10 IU/ml eCG (Foligon, Intervet International B.V., Boxmeer, Holland), 10 IU/ml hCG (Chorulon, Intervet International B.V., Boxmeer, Holland), and 10% porcine follicular fluid (v/v).

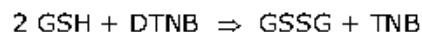
Within 30 min of slaughter, ovaries from prepubertal gilts were transported to the laboratory in saline containing 100 µg/ml kanamycin sulfate at 38°C, washed once in 0.04% cetrimide solution and twice in saline. Oocytes-cumulus cell complexes (COCs) were collected from antral follicles (3-6 mm diameter) by slicing, washed twice with Dulbecco's PBS supplemented with 1 mg/ml PVA and twice more in maturation medium previously equilibrated for a minimum of 3 h at 38.5°C under 5% CO₂ in air. Only COCs with a homogeneous cytoplasm and a complete and dense cumulus oophorus were used for the experiments. Groups of 50 COCs were cultured in 500 µl maturation medium for 22 h at 38.5°C under 5% CO₂ in air. After culture, oocytes were washed twice in fresh maturation medium without dibutyl cAMP, eCG and hCG and cultured for an additional 20-22 h (Funahashi and Day, 1993). This *in vitro* maturation system is commonly employed in pigs for several years and it is based upon the results from Funahashi et al. in 1997.

In the experiments with roscovitine, around 45-50 oocytes were allocated in a petri dish with 500µl of NCSU-37 without PMSG, HCG and dbAMPc and with 50µM of roscovitine during a period of 20-28h. Then, these oocytes were matured in the same way as the others (Funahashy and Day, 1993).

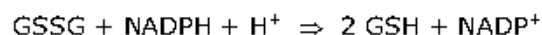
3.4 INTRACELLULAR GSH CONTENT

To analyse the content of intracellular glutathione in the matured oocytes, the method described by Tietze (1969) with modifications (Anderson, 1985) was carried out. This method is based in the cyclic test of the enzyme 5,5-dithiobis-(2-acid nitrobenzoic)-glutathione reductase (DTNB-GSSG) that detects into the oocytes the reduced and oxidized glutathione.

This cyclic test occurred in two steps. In the first one, the reduced glutathione with DTNB is oxidized:



And in the second step the reductase enzyme DTNB-GSSG catalyzes the following reaction:



GSH: reduced glutathione.

GSSG: oxidized glutathione.

DTNB: 5,5-dithiobis-(2-acid nitrobenzoic).

TNB: 5-thio-2-acid nitrobenzoic.

NADPH: reduced dinucleotid phosphate of nicotinamide and adenine.

NADP⁺: oxidized dinucleotid phosphate of nicotinamide and adenine.

The total content of glutathione can be estimated from the TNB production that is determined to 412 nm (UV) of absorbance.

The **employed reactive** were:

- Phosphoric acid (H₃PO₄).
- Phosphated sodic hidratated (NaH₂PO₄H₂O).
- Phospahted sodic (Na₂HPO₄).
- acid etilen-diamine-tetracetic (EDTA).
- DTNB.
- GSH.
- DTNB-GSSG reductase.
- NADPH.

The employed solutions were prepared with ultrapure water at the concentrations indicated in table 6.

TABLE 6. Solutions for glutathione assay.

SOLUCIONS	CONCENTRATION
H ₃ PO ₄	1.25 M
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.2 M
Na ₂ HPO ₄	0.2 M
EDTA	10 mM
DTNB	6 mM
Glutatione reductase	266 UI/ml

Solutions were prepared as follows: The buffered and NADPH stock solutions:

- **Buffered stock solution:** a 0.2 solution of sodic hydrated phosphate and 10 mM of EDTA (solution A) was prepared. Another similar solution but with sodic phosphate (solution B) was also prepared. Finally, the buffered stock solution was prepared by mixing both solutions A and B until reaching a pH of 7.2.

- **NADPH solution:** it consisted of a solution of 0.3 mg NADPH per ml of buffered stock solution.

Samples were prepared following the methodology describes by Funahashi et al. (1994b). Briefly, *cumulus oophorus* cells were removed by successive gently aspiration through an automatic pipette (Nichiryo). Denuded oocytes were aspirated into three times washed in a buffered stock and samples of 30 oocytes were aspirated into a volume of 5 μ l. Samples were introduced at the botton of Eppendorf tube and 5 μ l phosphoric acid 1.25 M were added. The tube was stored immediately at - 20°C until analysis.

The standards were prepared the same moment of the assesment with 5 GSH know solutions: 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 and 0.5 mM. For each one of them it was mixed 5 μ l of the GSH solution respectively, and 5 μ l of phosphoric acid 1.25 M. The standard "cero" was prepared with 5 μ l of PBSdm and 5 μ l of phosphoric acid 1.25 M.

The oocytes samples were thawed at room temperature and after a volume of 700 μ l NADPH solution, 100 μ l DTNB solution and 190 μ l purified water, was added to each one. The oocytes were maintained at room temperature during 15 minutes and then 10 μ l of GSH reductase was added to start the reaction. Then, samples were introduced in a spectrophotometer (Beckman DU-40) where the TNB formation at 412 nm (UV) absorbance every 30 seconds during two minutes was assesed.

The GSH concentration of the samples was determine in every one by comparison with the Standard curve. Total quantity of glutathione was divided by the number of oocytes in the sample to obtain the total quantity of GSH per oocyte.

3.5 SPERM PROCESSING

Fresh semen was collected once a week from three stud boars of known fertility by the gloved hand method. The sperm rich fraction was collected, immediately transported to the laboratory and diluted in Beltsville thawing solution (BTS) at 15°C. The fresh diluted spermatozoa were used the same day as collection.

DPBS treatment involved the centrifugation of 10 ml of the fresh semen samples at 1200 xg for 3 min. The pellet was then resuspended in DPBS supplemented with 10% FCS to reach a concentration of 5×10^5 spermatozoa/ml.

3.6 INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION

Oocytes cultured for 44 h in maturation medium were mechanically denuded by gentle aspiration with a pipette. Denuded oocytes were washed twice in supplemented DPBS medium and transferred to ICSI drops. ICSI was conducted on a heated microscope at 200X magnification using a Nikon Diaphot 300 inverted microscope with attached micromanipulators. The ICSI medium used was DPBS supplemented with 10% FCS. Prior to ICSI oocytes were placed in a lid of Petri dish (1 oocyte per drop of 4µl of DPBS-FCS). In total 10-15 micro-drops were placed in each lid surrounding central sperm drops which contained 4 µl of DPBS-FCS and 1µl of the sperm suspension. The microdrops were covered with mineral oil (Sigma M-8410). ICSI was performed as described by Probst and Rath (2003). Briefly, one single sperm was immobilized by crushing the mid-piece with the tip of the injection pipette. The immobilized sperm was aspirated with the tail first. Thereafter, the injection pipette was moved into the drop containing the oocytes to be injected. A single oocyte was fixed with the holding pipette positioning the polar body in a 6 or 12 o'clock position. The injection pipette was pushed through the *zona pellucida* and the oolemma into the cytoplasm at a 3 o'clock position. Small amounts of cytoplasm were sucked into the injection pipette in order to prove that the sperm was introduced through the oolemma into the cytoplasm. Subsequently, the aspirate with the immobilized spermatozoon was released into the cytoplasm. The temperature was maintained at 38.5°C through the whole procedure using

a heated microscopical stage. The injected oocytes were placed in TALP medium.

At 22 hours after ICSI, samples of oocytes/zygotes were fixed with acetic alcohol, stained with 1% (w/v) lacmoid and examined at 400x magnification under a phase contrast microscope. Oocytes with at least one pronucleus (PN) were classified as activated. Stages with two pronuclei were classified as fertilized in the sperm injected group and as parthenogenetically activated in the sham group. Oocytes with non-classifiable forms were named as "other".

3.7 EMBRYO CULTURE

After 22h in TALP medium, putative zygotes were washed three times in NCSU-23 previously equilibrated overnight, transferred in a 4-well Nunc multidish containing 500 µl of NCSU-23 per well, and incubated at 38.5°C and 5% CO₂ in 100% humidified air. Forty eight and 144 h after fertilization, cleavage rate and blastocyst formation, respectively, were evaluated under a stereomicroscope. Blastocysts were then placed on a slide, air-dried, and fixed in absolute ethanol for 24 h. Nuclei were counted under an epi-fluorescence microscope by staining with Hoechst 33342 (10 µg/ml in 2.3% sodium citrate).

3.8 VALORATION OF RESULTS

3.8.1 ASSESMENT OF NUCLEAR STATUS

The nuclear status were assesed following the technique described by Chang (1952) with minor modifications (Coy, 1992). Briefly, after the fixation period in ethanol-acetic (1:1) during 24h, the oocytes were stained with lacmoid.

3.8.2 ASSESMENT OF PRONUCLEAR FORMATION

After the culture in TALP medium during 22h, the injected oocytes were evaluated following two methods in relation to the experiment; Experiment 1 and 2.4 were realized following the technique described by Chang (1952) with minor modifications (Coy, 1992). And experiments 2.6, 2.7 and 3 were evaluated with Hoechst fluorochrome. Oocytes were fixed for 15 min (2% glutaraldehyde in PBS), stained for 15 min (1% Hoechst 33342 in PBS) and finally washed in PBS containing 1 mg/ml polyvinylalcohol and mounted on glass slides.

Oocytes were examined under an epifluorescence microscope at 200X and 400X (Leika[®]). The oocytes with the metaphase plate were considered as not activated, and the others were considered as activated (with female pronucleus, two cells stage or others). The oocytes with two pronuclei (with or without visible PB in the stain) and two cells embryos were considered fertilized.

The variables analyzed after ICSI were:

- Rate of degenerated oocytes (**% Degeneration**) in relation to the total injected oocytes.
- Rate of activated oocytes (**% Activation**) in relation to the not degenerated oocytes. The oocytes in the stage previous to two pronucleus 2PN (1PN and one compact or descondensed sperm head; **% Pre-2PN**), oocytes in the two pronuclear stage or two cells embryos (**% 2PN and % Embryos**), the oocytes without classification (**% others**).

3.8.3 ASSESMENT OF EMBRYO DEVELOPMENT

Cleavage embryos were considered those that appear in two-four cells (homogeneous blastomeres) after 48h post injection. Following 7 days of culture, the zygotes that were visually like blastocyst were isolated under stereomicroscope and were put in warm PBS. Then, embryo quality was assesed. Number of blastomeres per embryo was counted (Dobrinsky *et al.*, 1996). Briefly, the oocytes were fixed in alcohol during 24h, afterwards,

they were stained with Hoescht 33342 solution with 1% in PBS to stain the nucleus. Finally, they were visualized in a fluorescent microscope at 400X and 495 nm wavelength. All nuclei were counted like the total number of nucleus per blastocyst.

The variables were:

- Rate of cleaved embryos (**% Cleavage**): The numbers of embryos in 2-4 cells stage were counted in relation to the total embryos injected and cultured.
- Rate of blastocyst (**% Blastocyst**): the number of blastocyst in relation to the total embryo cleaved.
- Average number of cells per blastocyst (**N cells/blastocyst**): the average number of stained nucleus per blastocyst.

3.9 EMBRYO TRANSFER

Multiparous crossbred sows physiologically synchronized were used to surgical embryo transfer. Oviducts from animals which had showed heating 72 h before embryo transfer were exposed through mid-ventral incision under general anesthesia, as we have previously described (Coy et al., 1993). Over 50 putative embryos (immediately after injection) were introduced in one oviduct by a Tom Cat Catheter (Kendall Co., Mansfield, MA, USA) connected to an insulin syringe containing PBS at 37°C. The catheter was later observed under stereomicroscope in order to check that all embryos were transferred into the oviducts. The sows were kept under the usual farm conditions and 25 to 28 days after transfer pregnancy diagnosis was carried out by ultrasonography (Echoscan T-100).

3.10 EXPERIMENTAL DESIGN

EXPERIMENT 1. EFFECT OF CULTURE TIME IN TALP MEDIUM ON ICSI AND IN VITRO EMBRYO DEVELOPMENT.

Experiment 1.1: Effect of time culture in TALP medium on ICSI parameters.

The assesment of fertilization was realized after 20-24h of injection. Part of the injected oocytes were fixed and stained with lacmoid.

This experiment was realized in 6 replicates and the total oocytes used were 361.

Experiment 1.2: Effect of time culture in TALP medium on in vitro embryo development

The assesment of embryo development was done after culture of the zigotes in NCSU-23.

This experiment was realized in 4 replicates and the total oocytes used were 258.

EXPERIMENT 2. EFFECT OF ROSCOVITINE ON IN VITRO OOCYTE MATURATION, ICSI AND IN VIVO EMBRYO DEVELOPMENT.

Before running the experimental work, 831 oocytes in 4 replicates were stained just after collection with BCB to approve the growth stage and to check if culture in roscovitine for 22 h inhibited the last step of growing.

Experiment 2.1: Nuclear status after 22 h culture in roscovitine

This experiment was carried out to know if the culture of oocytes in NCSU-37 medium without dibutyryl cAMP, eCG and hCG and with 50 μ M roscovitine for the first 22 h of maturation (ROS group, n=152) kept the nuclear stage at the same level than that found in the oocytes just after recovery (Before culture group, n=156). As control groups we employed oocytes cultured for 22 h in supplemented NCSU-37 medium under usual IVM conditions, which included dibutyryl cAMP, eCG and hCG (A group, n=173) and oocytes cultured for 22 h in the same NCSU-37 medium without dibutyryl cAMP, eCG and hCG (B group, n=164). Doing so, we were able to see if the inhibitory effect of roscovitine on the nuclear progression was similar or not to that demonstrated by dibutyryl cAMP, which blocks only oocytes at stages beyond the GV II-stage [28] and to compare the

nuclear stage at 22 of inhibited oocytes (ROS and A groups) and those under supposed spontaneous resumption of meiosis (B group).

After culture, oocyte nuclear status (GV-0 to Metaphase II) was recorded in all groups. This experiment was performed in 4 replicates.

Experiment 2.2: Nuclear progression after IVM with a prematuration period in roscovitine.

In order to assess the reversibility of the treatment with roscovitine, COCs were cultured 44 h under permissive maturation conditions in each of 3 replicates with (ROS-IVM group, n=153) or without (IVM group, n=161) a previous culture period of 22 h in presence of 50 μ M roscovitine. Nuclear stage was recorded by Hoechst staining.

Experiment 2.3: Oocyte glutathione content after roscovitine treatment.

This experiment was designed to know the effect of roscovitine on the intracellular GSH content of the oocytes just after collection, at 22 h of culture with or without roscovitine, and after maturation with or without a preculture in roscovitine. In seven replicates, 960 COCs were collected and allotted in five groups: Before culture group (oocytes processed just after collection), A group (oocytes cultured in supplemented NCSU-37 medium with dibutyryl cAMP, eCG and hCG), ROS group (oocytes cultured 22 h in supplemented NCSU-37 medium without dibutyryl cAMP, eCG and hCG and with 50 μ M roscovitine), IVM group (oocytes cultured for 44 h under the described step-wise in vitro maturation system) and ROS-IVM group (oocytes cultured for 22 h as the ROS group and for a further 44 h as the IVM group). GSH content was measured as above described.

Experiment 2.4: ICSI and full development of roscovitine treated oocytes.

Just after recovering, oocytes were cultured in presence of 50 μ M of roscovitine for 22 h. Following this period of time, oocytes were washed and allowed to mature for 44 h under permissive conditions (ROS-IVM group). Other COCs were also collected and introduced in the IVM system at the

same time than ROS-IVM group. Matured oocytes from both groups were then injected and after 20-24 h post-injection samples of the putative embryos were processed to assess the ICSI variables. The remaining cells were transferred into the oviduct of physiologically synchronized sows (one sow per group and replicate, ten sows as a total). Pregnancies were assessed by ultrasonography 25-28 days after transferring.

This experiment was realized in xx replicates and the total oocytes used were 254.

Experiment 2.5. Effect of IVM time on roscovitine treated oocytes and fertilized by ICSI.

This experiment was carried out to evaluate the maturation time in different fertilization (ICSI) parameters. COCs were preadurate in roscovitine (50 μ M), and then were matured following normal maturation culture during 36h, 40h and 44h. Next, putative embryos were transferred to TALP medium during 20-24h and then were stained with Hoechst 33342.

This experiment was realized in 7 replicates and the total oocytes used were 456.

Experiment 2.6: Effect of roscovitine pre-maturation and maturation during 36h.

Just after recovering, oocytes were cultured in the presence of 50 μ M roscovitine. Then, oocytes were washed and allowed to mature for 36 h under permissive conditions (ROS-IVM group). Other COCs were also collected and introduced in the IVM system at the same time as ROS-IVM group. Matured oocytes from both groups were then injected and 20-24 hpi, samples of the putative embryos were processed to assess the ICSI variables.

This experiment was realized in 3 replicates and the total oocytes used were 192.

EXPERIMENT 3. EFFECT OF InsP_3 ON IN VITRO EMBRYO DEVELOPMENT.

The object of this experiment was to increase the oocyte activation and as a result the final blastocyst rate through the InsP_3 injection together with the sperm. COCs were matured following the normal protocol of IVM during 40h. The InsP_3 injection was realized following the same protocol as the ICSI. The microinjection pipete was filled with InsP_3 medium or buffer solution. The volume of the IP_3 was approximately the length of the sperm. Four groups of injection were realized:

- **Control group**; sperm injected oocytes.
- **InsP_3 group**: sperm and InsP_3 injected oocytes
- **Sham-buffer group**; buffer injected oocytes. The InsP_3 or buffer activation capacity was evaluated in this way.
- **Sham- InsP_3 group**: InsP_3 injected oocytes. The InsP_3 activation capacity without the sperm was evaluated in this way.

Embryo development was evaluated after NCSU-23 culture, as explained in the embryo culture chapter. The following were evaluated:

- Cleavage rate, blastocyst rate and number of cells per blastocyst.

This experiment was realized in 3 replicates with a total of 215 oocytes.

EXPERIMENTAL DESIGN

NCSU-37_A: NCSU-37 supplemented with eCG, hCG y dbAMP_c

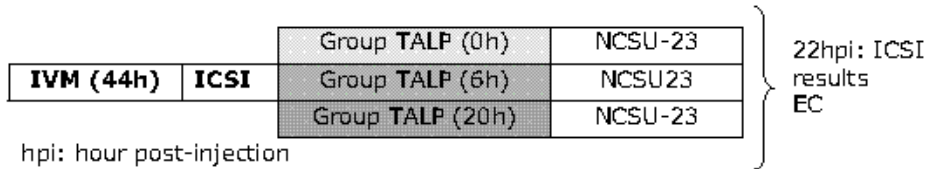
NCSU-37_B: NCSU-37

NCSU-37_{ROS}: NCSU-37 supplemented with 50µM roscovitine

IVM: 22 h in NCSU-37_A following 22 h in NCSU-37_B

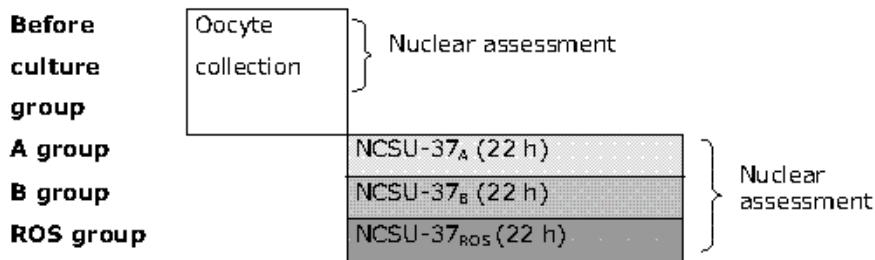
EC: embryo culture

Experiment 1. Effect of culture time in TALP medium on embryo development and ICSI

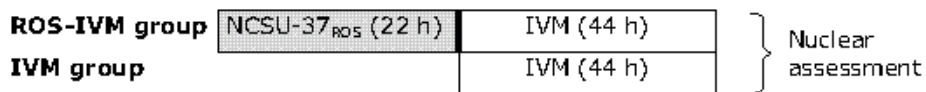


Experiment 2. Effect of roscovitine on *in vitro* oocyte maturation, ICSI and *in vivo* embryo development

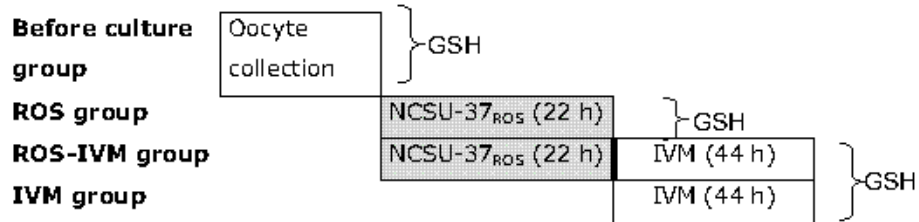
2.1 Nuclear Status After 22 h Culture in Roscovitine



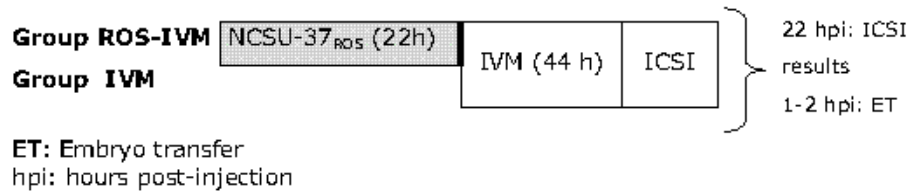
2.2 Nuclear Progression After IVM With a Prematuration Period in Roscovitine



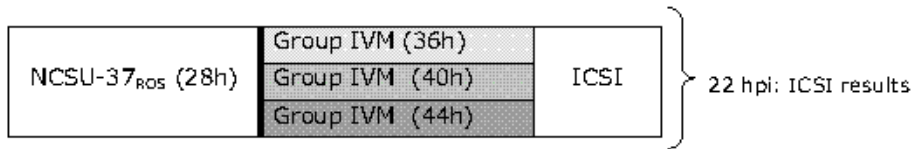
2.3. Oocyte Glutathione Content After Roscovitine Treatment



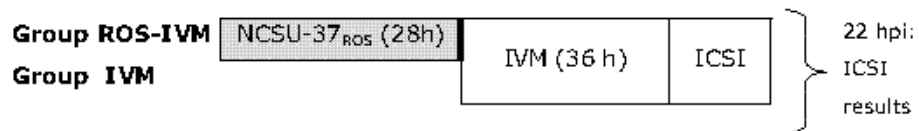
2.4 and 2.5. ICSI and Full Development of Roscovitine Treated Oocytes

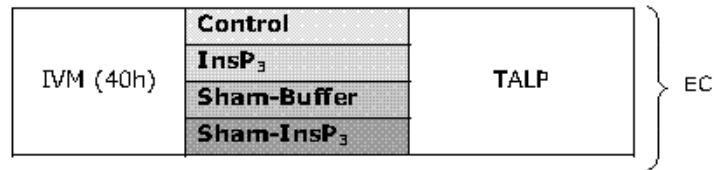


2.6. Effect of IVM duration on roscovitine treated oocytes and fertilized by ICSI



2.7. Effect of roscovitine pre-maturation and maturation during 36h



Experiment 3. Effect of InsP_3 injection on in vitro embryo development.**3.11 STATISTICAL ANALYSIS**

For the statistical analysis SPSS 11.5 for Windows was used. Data are presented as the mean \pm SEM and all percentages were modelled according to the binomial model of variables. The variables in all the experiments were analyzed by one-way ANOVA. When ANOVA revealed a significant effect, values were compared by the Tukey test. A p value <0.05 was taken to denote statistical significance.

RESULTS

4

RESULTS

4.1 EFFECT OF CULTURE TIME IN TALP MEDIUM ON EMBRYO DEVELOPMENT AND ICSI

4.1.1 Effect of time culture in TALP medium on ICSI parameters

As shown in table 7, a positive effect of oocyte culture in TALP medium was observed.

The activation and degeneration rates were not affected by the time culture in TALP in relation to the control group. The activation rate was approximately 85% and there was only 18% of degeneration in the three groups. Although, the embryo rate was higher for 6h and 20h (9.72 ± 3.92 and 10.68 ± 3.06) in relation to the 0h group (0%) ($p < 0.05$).

TABLE 7. Media and SEM for different fertilization parameters of the injected oocytes cultured in different time periods in TALP medium, in 6 replicates. Evaluation at 22 hpi.

TALP h	Deg (%)	Act (%)	Pre-2PN*	2PN*	Embryos*	Others*
0h N=152	12.50±3.26	91.21±2.98	28.92±5.01	55.42±5.49	0 b	15.66±4.01
6h N=105	23.81±4.18	90.00±3.38	22.22±4.93	59.72±5.82	9.72±3.92 a	8.33±3.28
20h N=104	19.08±0.03	83.74±3.34	26.21±4.35	56.31±4.91	10.68±3.06 a	6.80±2.42
P	0.1076	0.2003	0.6393	0.8528	0.0096	0.1160

* In relation to the activated oocytes

a, b Different letters in the same column indicate values significantly different ($P < 0.05$)

4.1.2 Effect of time culture in TALP medium on in vitro embryo development

As shown in table 8, no differences in any of the variables studied were found. Cleavage rate was approximately 60% for the three groups with a low rate of blastocysts. The number of blastocysts was 3 for the control group(20h), seven for the 6h group and only one for the 0h group.

TABLE 8. Media and SEM for different *in vitro* embryo development parameters post-ICSI and different time culture in TALP medium, in 4 replicates. Cleavage rate evaluated at 48 hpi and blastocyst rate at 7 days post- injection.

TALP h	Cleavage (%)	Blastocysts (%)	N cells/blastocyst
0h N=91	54.55±5.71	4.76±3.33	50
6h N=90	64.44±5.07	12.07±4.31	41.71±8.32
20h N=77	68.13±4.91	4.84±2.75	37.66±8.69
P	0.1791	0.2424	0.8726

4.2 EFFECT OF ROSCOVITINE ON IN VITRO OOCYTE MATURATION ICSI AND IN VIVO EMBRYO DEVELOPMENT

4.2.1 Nuclear status of oocytes after 22h of culture in roscovitine

As shown in table 9, Roscovitine was effective to inhibit the meiotic resumption after 22 h of culture, giving a higher percentage of GV-I stage oocytes and a lower percentage of GV-III stages oocytes in ROS group than in A or B groups (Table 9). Oocytes just before culture and after treatment with roscovitine were similar for both nuclear stages. The percentage of oocytes reaching the Met-I stage was higher in the B group than in the remaining three groups.

TABLE 9. Nuclear status of pig oocytes after 22 h culture in NCSU-37 with or without hormonal supplements, or with 50 μ M .

Nuclear stage (%)	Before culture	A	B	ROS	P
N	156	173	164	152	
GV-0	9.6 \pm 2.4 a	0.6 \pm 0.6 b	0 b	0 b	<0.001
GV-I	60.9 \pm 3.9 a	37.0 \pm 3.7 b	31.7 \pm 3.6 b	63.2 \pm 3.9 a	<0.001
GV-II	8.3 \pm 2.2 a	37.0 \pm 3.7 b	26.2 \pm 3.5 b	29.6 \pm 3.7 b	<0.001
GV-III	7.0 \pm 2.1 a	23.7 \pm 3.2 b	20.1 \pm 3.1 b	7.2 \pm 2.1 a	<0.001
GV-IV	7.0 \pm 2.1 a	0 b	3.7 \pm 1.5 ab	0 b	<0.001
Metaphase I	5.1 \pm 1.8 ab	1.2 \pm 0.8 a	13.4 \pm 2.7 b	0 a	0
Anaphase I	0	0	1.2 \pm 0.9	0	0.12
Telophase I	0.6 \pm 0.6	0	2.4 \pm 1.2	0	0.06
Metaphase II	1.3 \pm 0.9	0.6 \pm 0.6	2.4 \pm 1.2	0	0.53

a, b Different letters in the same row indicate values significantly different ($P < 0.05$)

A: 22 h culture in NCSU-37 with hCG, eCG, dibutyryl cAMP

B: 22 h culture in NCSU-37 without hCG, eCG, dibutyryl cAMP

ROS: 22 h culture in NCSU-37 without hCG, eCG, dibutyryl cAMP and with 50 μ M

4.2.2 Effect of roscovitine on nuclear progression of oocytes

After maturation for 44 h, oocytes from ROS-IVM group resumed meiosis and reached Metaphase II stage at the same levels than IVM group, over 85% (Table 10).

TABLE 10. Nuclear status of pig oocytes after in vitro maturation with (ROS-IVM) or without (IVM) a prematuration period of 22 h in 50 μ M roscovitine.

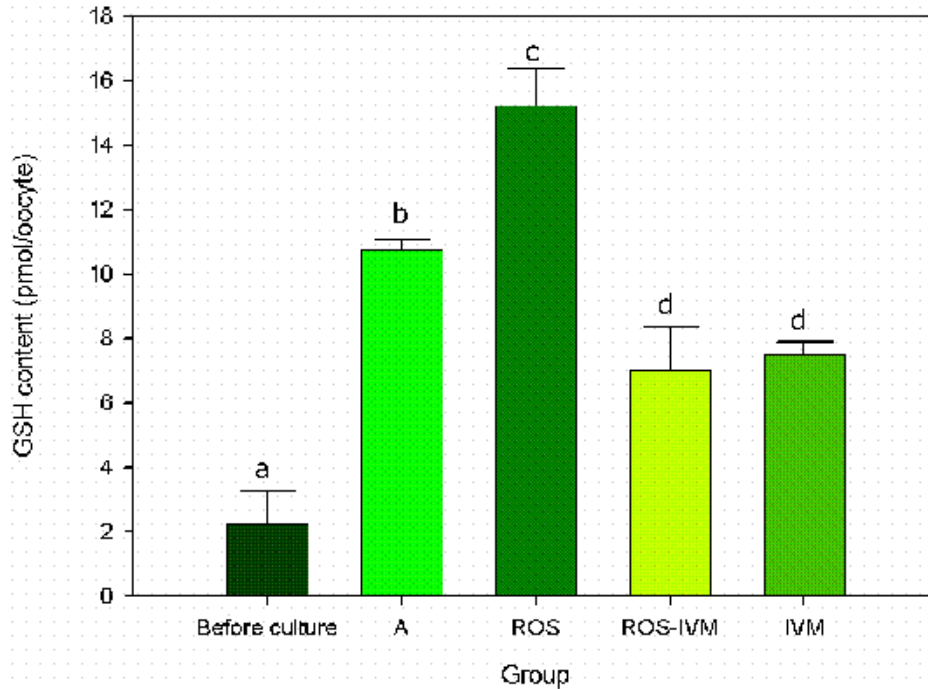
Nuclear Stage (%)	IVM	IVM-ROS	P
N	161	153	
GV-0	0.6 \pm 0.6	0	0.33
GV-I	6.2 \pm 1.9	4.6 \pm 1.7	0.52
GV-II	1.9 \pm 1.1	0	0.09
GV-III	1.2 \pm 0.9	1.3 \pm 0.9	0.96
GV-IV	0 a	6.5 \pm 2.0 b	<0.001
Metaphase I	1.9 \pm 1.1	0.6 \pm 0.6	0.34
Anaphase I	0	0	1
Telophase I	0.6 \pm 0.6	1.3 \pm 0.9	0.53
Metaphase II	87.6 \pm 2.6	85.6 \pm 2.8	0.61

a, b Different letters in the same row indicate values significantly different ($P < 0.05$)

4.2.3. Effect of roscovitine on intracellular GSH content

As shown in figure 12, intracellular GSH content increased after oocytes were cultured. When oocytes were kept for 22 h in culture, GSH content increased from 2.24 to 10.74 pmol/oocyte, and this amount was still higher when roscovitine was present during culture (15.23 pmol/oocyte). After IVM, no differences were observed independently of a 22 h prematuration period with (ROS-IVM) or without (IVM) roscovitine, being 7.02 and 7.48 pmol/oocyte, respectively. However, both groups showed a lower amount of GSH than ROS group.

FIGURE 12. Intracellular GSH content in pig oocytes before culture, after 22 h culture in NCSU-37 with with hCG, eCG and dibutyryl cAMP (A group); without hCG, eCG, dibutyryl cAMP and with 50 μ M roscovitine (ROS group) and after a conventional IVM (22 h A + 22 h B) with (ROS-IVM) or without (IVM group) preculture in roscovitine.



a, b, c, d Different superscripts represent significant differences

($P < 0.001$)

4.2.4. Effect of roscovitine on fertilization by ICSI

The results of this experiment show that the activation and degeneration rates were not affected by the inhibitor. Activation rates was around 80% and degeneration rates was around 15% (table 11). The 2PN rates was around 50% for both groups. An effect was observed for the

variable embryos, the ROS group was higher in embryo rate than the control group (22.22% and 7.14%, $p < 0.05$, for ROS and control, respectively). The others rate was higher for the ROS group than for the control group (0% vs 7.78% respectively) ($p < 0.05$).

TABLE 11. Media and SEM for different ICSI parameters with or without Roscovitine prematuration and 44h of IVM, in 7 replicates. Evaluation at 22hpi.

	Deg (%)	Act (%)	Pre-2PN*	2PN*	Embryos*	Others*
Control N=115	21.74±3.96	80.46±4.28	34.29±5.71	55.71±5.98	7.14±3.10 ^a	0 ^a
ROS N=139	16.55± 3.16	81.31±3.79	21.11±4.33	48.89±5.30	22.22±4.41 ^b	7.78±2.84 ^b
p	0.8818	0.2946	0.0628	0.3945	0.0090	0.0169

* In relation to the activated oocytes

a, b Different letters in the same column indicate values significantly different ($P < 0.05$)

4.2.5 Effect of roscovitine on in vivo embryo development

As the results show (table 12), ICSI embryos were capable to began pregnancies when they were transferred to female receptors. Sixty percent and 80% of transferred sows showed delayed estrus more than 23d for both groups. 20% of sows showed positive pregnancy diagnosis with the presence of embryo vesicles between 21-25d. Ten percent had a visible abortion in both groups.

TABLE 12. Results of *in vivo* embryo development for prematured in roscovitine oocytes and fertilized by ICSI, in 10 replicates.

	N	Delayed estrus (>23d)	Embryo vesicles	Visible abortus
CONTROL	10	6	2	1
ROS	10	8	2	1

4.2.6 Effect of IVM time on ICSI oocytes prematured in roscovitine

It can be observed in this experiment that no significant differences exists in activation and degeneration rates for the different groups of oocytes prematured in roscovitine and matured at different times (83.61% vs 81.68 vs 90.0%) and (19.21% vs 17.61% vs 17.12%) for activation and degeneration rates respectively (table 13).

However, a significant effect is observed for the Pre-2PN rate (18.63%; 29.91%; 41.28% $p < 0.05$) and 2PN rate (73.53%; 61.68%; 55.05 % $p < 0.05$) for 36, 40 and 44h respectively. Table 13.

TABLE 13. Media and SEM for different ICSI parameters in oocytes matured during different IVM times and preincubated in roscovitine, in 7 replicates. Evaluation at 22hpi.

IVM	Deg (%)	Act (%)	Pre-2PN* (%)	2PN* (%)	Others* (%)
36h n= 151	19.21±3.21	83.61±3.36	18.63±3.84a	73.53±4.39a	7.84±2.67
40h n=159	17.61±3.03	81.68±3.39	29.91±4.47ab	61.68±4.72ab	8.41±2.69
44h n=146	17.12±3.12	90.08±2.72	41.28±4.73b	55.05±4.78b	3.67±1.39
P	0.152	0.887	0.002	0.019	0.312

* In relation to the activated oocytes

a, b Different letters in the same column indicate values significantly different ($P<0.05$)

4.2.7 Effect of roscovitine and 36h of IVM on fertilization by ICSI.

No significant effect of roscovitine prematuration and the posterior IVM of 36h was observed in this experiment for any of the analyzed variables. Activation rates was around 80% for both groups. Degeneration rates were around 10% for both groups (table 14).

The other analyzed variables were not affected by the treatment. Embryo rate was around 70% for both groups (72.13% vs 72.00%) (table 14).

TABLE 14. Media and SEM for different ICSI parameters with or without roscovitine prematuration and 36h of IVM, in 4 replicates. Evaluation at 22hpi.

36hIVM	Deg (%)	Act (%)	Pre-2PN*	2PN*	Others*
Control N= 90	14.14±3.72	79.22±4.65	13.11±4.35	72.13±5.78	14.75±4.57
ROS n= 102	7.84±2.67	79.79±4.16	22.67±4.86	70.67±5.29	6.67±2.90
P	0.928	0.145	0.155	0.852	0.125

* In relation to the activated oocytes

4.3 EFFECT OF $InsP_3$ ON IN VITRO EMBRYO DEVELOPMENT

As show in table 15 significant differences are found for the cleavage variable. Sperm injected oocytes groups (control and $InsP_3$) were higher than sham groups (buffer and IP_3). Cleavage rate was around 60% for sperm injected oocytes and 10% for sham groups. Blastocysts rate was very low for the four groups (8 for the control group, 3 for $InsP_3$ group and only one for sham- $InsP_3$ group), thus the results can not be inferred.

TABLE 15. Media and SEM for *in vitro* embryo development parameters in sperm injected oocytes (control and **InsP₃**) and sham injected oocytes (buffer and **InsP₃**), in 3 replicates. Cleavage rate evaluated at 48 hpi and blastocyst rate at 7 days post- injection.

	Cleavage (%)	Blastocysts (%)	N°Cell/Blast
Control n=58	68.97±6.12a	13.79±4.56a	31.25±5.35
InsP₃ n=54	59.26±6.67a	5.56±3.14ab	22.33±7.88
Sham-buffer n=55	10.42±4.44b	0b	0
Sham-InsP₃ n=48	20±5.44c	1.82±1.81b	21
P	<0.001	0.008	0.610

DISCUSSION

DISCUSSION

Currently, there is considerable interest in producing large amounts of pig oocytes (by *in vitro* maturation techniques) and embryos (by *in vitro* fertilization (IVF) techniques) with the intention of progressing in both basic and biomedical research. The pig has become increasingly more important as a potential organ donor for xenotransplants, as well as a transgenic animal to produce specific proteins, given the biological similarities it has with human beings. Attempts of cloning and producing transgenic pigs by means of pronuclear injections require mature oocytes and zygotes, respectively. However, surgically obtaining oocytes and embryos from donor animals proves to be an expensive procedure, it is time-consuming, and the quantity of biological material obtained is limited. It is for these reasons that the effective use of ovaries originating from the abattoir in order to produce mature oocytes and embryos through *in vitro* techniques is crucial (Abeydeera, 2002).

As we have already stated, the general objective of this study was to increase the performance of the *in vitro* embryo production in pigs, which scarcely reaches 15% with the present-day methodology used. To achieve this objective, our first step consisted in looking for the possible reasons for this low performance from among the bibliography sources, and in applying the acquired knowledge with the intention of formulating solutions. The factors affecting this process were basically the following: the complications associated with the *in vitro* maturation process, polyspermy, and the inadequate embryo culture conditions. On the one hand, the polyspermy problem is solved by introducing the ICSI technique, since only one sperm is placed inside the oocyte. However, the already low blastocyst rate obtained through traditional IVF after the embryo culture, drastically drops

after ICSI. The reasons behind this failure may partially lie in the ICSI technique itself, and in this case, the problems associated with this methodology may not be entirely avoided (plasmatic oocyte membrane damage, microtubular system disruption with the injection pipette...). However, we can work on the causes related to the oocyte, to the sperm or to the zygote. With regard to the sperm factor, the sperm along with all of its membranes is placed inside the ovocyte during the ICSI technique, which does not occur in physiological fertilization. This factor was previously studied in our laboratory when fresh sperm as opposed to cryo-preserved sperm were used, and the differences mainly observed concerned both the boar and the preservation method used. However, the blastocyst rate only increased in one of the boars used (García-Roselló, 2003). For this reason, we decided to focus this study on both the oocyte and zygote, with the intention of increasing its developmental capacity. The first step was to optimize the *in vitro* fertilization sequence and the embryo culture (IVF, EC) media that are employed in most pig laboratories. Secondly, we attempted to improve the *in vitro* maturation system by introducing meiotic inhibitors, such as roscovitine, and the *in vivo* embryo development of the ICSI zygotes was assessed under these conditions. The optimal time for *in vitro* maturation was also studied in this experiment by comparing three commonly used IVM times (36, 40 and 44 h). Finally the InsP_3 effect on *in vitro* embryo development was studied to verify whether the problem actually lay in the necessity of artificially activating the oocyte-zygote during ICSI in order to facilitate calcium oscillations.

5.1 THE TIME EFFECT THAT THE CULTURE IN TALP MEDIUM HAS ON BOTH ICSI AND *IN VITRO* EMBRYO DEVELOPMENT PARAMETERS.

Given the expansion achieved cloning techniques over recent years, the *in vitro* culture media used to develop zygotes are shown to be still inefficient in most mammalian species. For this reason, a considerable number of research groups have been working on the identification of either beneficial or harmful factors present in the culture media affecting genome activation, blastomers cleavage capacity, blastocyst hatching, etc. Among other conclusions there is the well-known biphasic effect of the serum that inhibits the first cleavage, and yet it stimulates both the morula compactation and blastocyst formation (Lim *et al.*, 1994). It has been observed that this additive, so commonly employed as a protein source, actually reduces blastocyst cryotolerance and disturbs mRNA expression

patterns (Rizos *et al.*, 2002). On the other hand, as knowledge on the oviductal and uterine microenvironments increases, a common agreement arises regarding the need to use sequential media within which the components are changing at the same time as the developing embryo requirements are changing. An example of such are the culture media that have been designed in different species to eliminate glucose during the pre-compaction period, and to add it during the post-compaction period. These media are based on the fact that ATP production is very low during the first developmental stages, and also on the fact that the high glucose concentrations in these stages may be toxic for the embryo (Jiménez *et al.*, 2003).

In pigs, NCSU-23 (Petters and Reeds, 1991) is the most widely used medium for embryo culture. It was used in our study with all the new modifications. This medium contains fatty-acid free albumin, but not serum, insulin as a growth factor, essential and non essential amino acids, as well as glucose, among other substances. In order to improve the *in vitro* blastocyst rate after zygote culture through ICSI, we designed an experiment to verify whether the direct transfer of the zygotes to this medium (NCSU) (which has been used in different research projects: Kim *et al.*, 1998; Kolbe and Holtz., 1999; Lai *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1998, 2003) is one of the causes of low performance obtained. According to our hypothesis, the fact that the ICSI technique suppresses steps in the fertilization process related to gamete recognition, sperm-ZP binding, and the induction of the acrosome reaction or the oolema fusion, does not mean that a recently injected zygote is found in a pronuclear state, nor that its culture requirements are equivalent to a two-cell embryo. For this purpose, we decided to compare the effect that the culture times in TALP medium has on embryo development results before the transfer to NCSU-23 medium takes place. The pronuclear formation is produced in the TALP medium during traditional IVF (Coy *et al.*, 2002; Matás *et al.*, 2003) and the zygotes are transferred to the NCSU medium after a variable period of time between 6 and 20 h. However, no references contemplating the ideal culture time sequence between TALP and NCSU media of the recent injected pig zygotes were found in our bibliographic revision, even though references do exist which show that the pronuclear formation takes place during the first six hours after injection (Lee *et al.*, 2002).

According to our hypothesis, as pronuclear formation has taken place during the first six hours after injection, the fact that the zygotes are present in the IVF medium, which is enriched with calcium, pyruvate and lactate, means that this situation might improve, as could the early stages of embryo development. Maintaining these zygotes in this medium for a lengthy period of time (20 h) may also prove beneficial as this would provide sufficient time for the first embryo cleavages to be produced, since this occurs in the oviduct, before they are transferred to NCSU-23.

These results partially confirm our hypothesis, since those zygotes which were cultured for 6 or 20 hours in TALP medium reached the two-cell stage more quickly than those zygotes which were directly transferred to NCSU did. The fact that these first cleavages may be observed during the first 18-20 h post-injection in TALP medium indicates that the viability of these embryos would possibly improve, despite the fact that no significant effect was observed in the blastocyst rate at 7 days of culture. As previously demonstrated, the moment of the first cleavage is an important indicator of further developmental capacity (Lonergan *et al.*, 1999). An alternative explanation might be a quicker preimplantational development of male embryos in relation to female embryos when glucose is present in the medium (Larson *et al.* 2001), as is our case. Under our experimental conditions however, this possibility would not explain the differences found since the glucose concentration in both TALP and NCSU-23 medium was the same.

With regards to the remaining assessed parameters, where no differences between the three experimental groups were found, they may be useful to gauge the validity of our methodology. In this way, oocyte activation which was around 83% in all cases, is comparable to the results obtained by Katayama *et al.* (2002) where recently injected oocytes were cultured in IVF medium (TCM-199); or to those by Lee *et al.* (2003) with NCSU-23. In the same way, our pronuclear formation results at 22h, or our cleavage rates at 48h post injection, were similar to those obtained by other researchers (Kim *et al.*, 1998; Lai *et al.*, 2001; Probst and Rath, 2003).

To conclude, the results of this first experiment confirm our hypothesis that the culture of injected oocytes in IVF medium before they are transferred to EC medium is beneficial for the zygotes. However, no differences were found between 6 or 20 h. We believe that a greater

presence of calcium in TALP medium (necessary for pronuclear formation) may be one of the reasons for these results. On the other hand, as we have indicated, pyruvate and lactate are important energy supplements for early stages of embryo development *in vitro* (Kim *et al.*, 2004). Recently, it has been reported that lactate and pyruvate supported greater development in terms of blastocyst formation rate and total cell number in PZM and NCSU-37 media (Kikuchi *et al.*, 2002; Yoshioka *et al.*, 2002). To this end, the greater proportion of embryos obtained with two cells in TALP may also be due to the presence of pyruvate and lactate in this medium (even though it is not an exclusive EC medium).

However, due to the low blastocyst rate obtained (below 10%), we decided to continue working on our second hypothesis, which proposed the introduction of changes to the IVM system, with an increase of cytoplasmic maturation, initially by using meiotic inhibitors, and secondly through the changes made in the IVM duration.

5.2 EFFECT OF THE ROSCOVITINE ON *IN VITRO* MATURATION, ICSI AND ON *IN VIVO* EMBRYO DEVELOPMENT.

Several ICSI studies conducted on pigs suggest the incomplete terminal differentiation of the oocyte as the main cause for the low capacity of *in vitro* matured oocytes developed after fertilization (Kolbe and Holth, 1999; Probst and Rath, 2003). In order to attempt solving these maturation problems, several meiotic inhibitors which maintained the oocyte at the GV stage have been employed. In this way, an attempt to mimic the internal *in vivo* conditions of the follicle is carried out, whereas an increase of the cytoplasmic maturation period is also attempted. Roscovitine (Meijer *et al.*, 1997) is one of the most effective MPF inhibitors; it has been proved that this may inhibit a lower quantity of kinases than 6-DAMP, but with more specificity in the ATP pocket binding of cdc2. Moreover, this has proved to be one of the inhibitors with less prejudicial effects, and although there are slight indications of a possible beneficial effect of preculture in roscovitine on further embryo development (Coy *et al.*, 2003; Marchal *et al.*, 2001; Mermillod *et al.*, 2000), interpretations of these results must be taken very cautiously since an evident effect of roscovitine on the inhibition of RNA synthesis has also been demonstrated (Ljungman and Paulsen, 2001). Furthermore, roscovitine does not prevent most of the modifications in phosphorylation patterns of the proteins observed during maturation

(Vigneron *et al.*, 2004a), and several cellular events involved in the maturation regulation of the bovine oocytes seem to be independent of both MPF activation and the resumption of meiosis (Vigneron *et al.*, 2004b).

The first step of this second experiment was to study the inhibitor effect of the roscovitine on nuclear oocyte status after 22 h of culture and after IVM. Next, we studied the effect this inhibitor had on cytoplasmic maturation by assessing the intracellular GSH content and the pronuclear formation after ICSI. Finally, the injected zygotes were directly transferred to the oviduct of recipient gilts to allow for *in vivo* development, given the EC results obtained in the previous experiment.

In our study, doses of 50 μ M roscovitine were sufficient to block the GVBD in more than 90% of oocytes after a 22-hour culture with similarities between control and ROS groups being evident for the GV-I and GV-III stages. On the contrary, when the IVM medium with no roscovitine was employed, oocytes started to spontaneously resume meiosis. Moreover, when the NCSU-37 medium without dibutyryl cAMP was used, the progression to stages beyond GV-IV was faster, since the inhibitory effect of dibutyryl cAMP (Funahashi *et al.*, 1997a) was absent. These data demonstrate that the progression of porcine oocytes to the GV-III stage in the presence of 50 μ M roscovitine is differently inhibited than in the presence of dibutyryl cAMP, or in the absence of inhibitors, since they remain at nuclear stages that are similar to those in the follicles, which were assessed just after recovery.

The effect of roscovitine on the resumption of meiosis has been previously showed in pigs. Ju *et al.* 2003 found that levels of 80-120 μ M of roscovitine were necessary to inhibit germinal vesicle breakdown (GVBD) in 83-91% of oocytes. However, their study assessed the nuclear stage of oocytes 44 h after beginning to culture in roscovitine, when the inhibitor activity could have decreased in the medium. In fact, roscovitine has an approximate 24-hour lifespan in blood plasma concentration (Meijer and Raymond, 2003). Likewise, Mc. Clue *et al.* (2002) observed that the effect of roscovitine peaked between 8 and 24 hours after the culture commenced.

The reversibility of the roscovitine effect on the nuclear maturation has been corroborated in our study by the high levels of Metaphase II stage oocytes reached after a 22-hour inhibition following a 44-hour culture in the

conventional IVM system. Similar results with 25 μ M roscovitine were obtained by Mermillod *et al.* (2000) in cattle. These authors demonstrated that GVBD was inhibited with this concentration, after a 24-hour culture. This was indeed a reversible effect, where more than 89% of the oocytes resumed meiosis when they were cultured without the inhibitor.

Despite our study demonstrating the reversibility of ROS by obtaining a high rate of MII oocytes, we cannot deduce whether the cytoplasmic maturation has actually increased. However, the fact that nuclear and cytoplasmic maturation are not always correlated is well documented (Coy *et al.*, 1999). The resumption of meiosis in oocytes after removal from roscovitine presumably re-starts MPF activation, yet it is not a prerequisite to ensure the cytoplasmic maturation of such oocytes. However, intracellular GSH content and the oocyte's ability to form the male pronucleus, feature among the commonly accepted parameters used to assess the cytoplasmic maturation in porcine oocytes (Coy *et al.*, 1999; Funahashi *et al.*, 1995; Sawai *et al.*, 1997).

GSH is dependent on the amount of cysteine made available to the cell (Meister and Tate, 1976). Cysteine is commonly added to the pig oocyte maturation medium at a 0.57mM concentration, and as a substrate for GSH synthesis, to promote male pronuclear formation (Yoshida *et al.*, 1993), and this was our case for NCSU-37. In our study, the GSH content of immature oocytes just after removal from follicles was lower than that found after 22 or 44h of culture in the IVM medium. The values obtained in the latter case were similar to those obtained by Brad *et al.* (2003). This indicates that the IVM system we employed was effective for the oocyte in GSH synthesis.

Interestingly enough, the GSH content was higher at 22h of culture than it was at 44h, which differs to what Yoshida *et al.* (1993) found, who reported a continuous increase in GSH content during IVM. On the one hand, these authors employed TCM-199 for IVM, which is a rich culture medium with readily available GSH precursors (cysteine, cystine, glutamic acid, glutamine and glycine) and even glutathione. However, NCSU-37 was used in our study which is only supplemented with cysteine and glutamine, where the former auto-oxidized to cystine in the maturation medium within 1 h (de Matos and Furnus, 2000), therefore it cannot be incorporated as easily as cysteine can (Yoshida & Takahashi, 1998). On the other hand, it has been reported that GSH synthesis is related to the acquisition of the

sperm nuclear decondensing ability during initial and mid phases of porcine oocyte maturation (Yoshida, 1993), and that GSH synthesis is responsible for high GSH levels in mature oocytes during the initial stages of hamster oocyte maturation (Perreault *et al.*, 1988). These observations suggest a strong GSH synthesis during the first half of oocyte maturation, and they would be in accordance with our results which showed a GSH peak after 22h of culture.

Another interesting finding in our study shows that those oocytes which were precultured in roscovitine for 22h had higher GSH levels than those cultured with dibutyryl cAMP for the same period of time. Cystine uptake activity is abolished by the mechanical disruption of gap junctional communication (Yoshida and Takahashi, 1998), and it has been suggested that GSH synthesis may be impaired due to the uncoupling of *cumulus* cells (de Matos *et al.*, 1998). Since roscovitine-treated oocytes showed no *cumulus* expansion as the dibutyryl cAMP-treated ones showed (Coy *et al.*, 2004; Marchal *et al.*, 2001; Schoevers *et al.*, 2004), the closest cooperation between the *cumulus* cells and oocyte would be maintained for a longer time, which would partly explain the higher GSH content observed in roscovitine-treated oocytes.

Our first data reveal that roscovitine does not affect the male pronuclear formation through ICSI fertilization. Moreover, no differences were found in any of the fertilization parameters assessed at 22 hours post injection (hpi). These results were expected given the similar GSH levels we found for *in vitro* matured oocytes precultured either with or without roscovitine, since it has been reported that male pronuclear formation is related to intracellular GSH content (Funahashi *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 1992). The activation and putative zygotes rate were similar to those results obtained by other researchers who did not use roscovitine (Kim *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003). As far as we are aware, no references to pig oocytes that had been prematured with roscovitine and fertilized by ICSI are found. Recently, Franz *et al.* (2003) worked with mare oocytes that had been prematured in ROS and fertilized by ICSI. They demonstrated that ROS is capable of increasing the development capacity when *cumulus*-enclosed oocytes are used, and a higher cleavage rate was also obtained. Our study has also demonstrated that the cleavage kinetics was higher in ROS oocytes, and that the cleavage rate assessed at 22hpi was higher in those oocytes. Our hypothesis was partially confirmed, as the moment the

first cleavage takes place is an important indicator of further embryo development capacity (Lonergan *et al.*, 1999), as we have already mentioned. However, this ROS effect cannot be demonstrated in cattle (Mermillod *et al.*, 2000).

We chose to place the zygotes in the best possible physiological medium immediately after the injection, such as the oviduct of recipient females, in order to achieve the best possible viability. The results of the *in vivo* experiment showed that the ICSI embryos prematured with ROS and transferred to female receptors, were capable of establishing pregnancies, yet they were not capable of reaching full term. The same results were observed for the control group.

Those few studies conducted with IVM-ICSI and ET showed that the number of piglets obtained was very low (Kolbe and Holtz, 2000; Lai *et al.*, 2001; Martin, 2000; Nakai *et al.*, 2003; Probst and Rath, 2003). Only one group obtained three piglets with IVM oocytes (Nakai *et al.*, 2003), and the success rate seemed to increase when *in vivo* matured oocytes are employed (Probst and Rath, 2003), the result of which was 6-7 piglets per litter. Therefore, in spite of the beneficial effect of ROS during early development stages, ICSI zygotes demonstrated difficulty in developing to term even in the most favorable culture conditions (in the pig oviduct).

It is known that only around 20-30% of the transferred embryos survive with traditional IVF, despite the improvements in pig IVP techniques (Abeydeera, 2002), and that only around 6 piglets are obtained from the transferred female (Abeydeera *et al.*, 1998). With a view to demonstrating that ROS was not detrimental for embryo development, and that live offspring could be obtained, a parallel study was carried out in our laboratory with traditional IVF (not presented in this study). Between 10-12 piglets were obtained for the control and ROS groups, respectively. This is the first study conducted that proves that live offspring can be obtained through IVM oocytes prematured with ROS (Coy *et al.*, 2004, 2005).

Similar results may be obtained by using ROS-prematured oocytes without the inhibitor. The use of cultured pig oocytes under meiotic inhibitor conditions with no decrease in development capacity is feasible, and it permits timetable flexibility in complex experiments. Therefore, not only would it prove to be a most useful tool for ovary collection in laboratories

which have no slaughterhouse in their vicinity, but it could also be a useful tool to study the influence of exogenous factors on oocyte terminal differentiation.

With this strategy (slaughterhouse oocytes kept with ROS for a few hours to adjust our protocol), we decided to study the effect that IVM duration has on ICSI performance. A well-known critical factor is oocyte age, and aged oocytes have a limited development capacity. Moreover, a lower MPF quantity exists in these oocytes. MPF is involved in p220 phosphorylation that binds tubuline and affects the microtubular formation, thus aged oocytes have a greater degree of fragmentation than the rest of oocytes do (Kikuchi, 2000). We decided it would be suitable and necessary to carry out this experiment since no references comparing IVM duration and ICSI fertilization in pigs exist.

Three different *in vitro* maturation times of common use in pig IVM were used, 36h (Ka *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1993), 40h (Galeati *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1997) and 44h (Coy *et al.*, 2003; Galeati *et al.*, 1991;). A preculture in ROS permits an adjustment to the injection timetable to be made, as previously mentioned. A previous experiment showed that ROS prematured oocytes and further 44-hour maturation obtained the two-cell stage more quickly than the control oocytes did. On this occasion, we attempted to investigate whether IVM duration could be reduced to increase embryo development post-ICSI with prematured oocytes.

The results confirmed our hypothesis. When the IVM time was reduced, the putative embryo rates were significantly higher than in the other groups. Embryo development and male pronuclear formation were slower when oocytes underwent a maturation of either 40 or 44h, rather than 36h. We found no bibliographic references comparing this IVM duration time and further ICSI fertilization. IVM times vary by 42 and 50h (Kim *et al.*, 1998; Lai *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003). However, the putative embryo rates in all these studies did not reach the rates obtained in our study (73.5%). We believe that most of the differences could be due to the different exogenous oocyte activation treatments involved, and also to both the oocyte quality and IMV system. The ovaries in our study came from hybrid commercial females weighing 85-95kg (8-9 months) which were close to puberty. Moreover, the slaughterhouse is only a an hour's distance from our laboratory, so the ovaries arrive in good condition. Oocytes are

obtained by slicing antral follicles. Oocyte collection is known to affect the posterior development. In 1997, Liu and Moor obtained higher nuclear maturation and cleavage rates in oocytes harvested by dissection rather than by aspiration. In our study, only the best follicles were sliced, so we selected most of the oocytes at this level. A second more thorough selection was performed under the stereomicroscope. Only COCs and a complete and dense *cumulus oophorus* were used for the experiments. This factor is also important in IVP systems (Coy and Romar, 2002)

Another crucial factor could be the age of oocytes, as previously verified. Aged oocytes have less fertilization ability than normal ones have due to the lower H1kinase amount, and also to the lower quantity of activated MPF (Kikuchi *et al.*, 2000). Funahashi *et al.* (1997a) demonstrated that around 47% of the oocytes reached MII at 36h of IVM, so most oocytes were old at the time of the *in vitro* fertilization.

In cattle however, it has been demonstrated that roscovitine prematurated oocytes reached the MII stage earlier than the non prematurated oocytes did. This fact is not yet demonstrated in pigs. In order to verify that the differences observed in our study had no relation with roscovitine prematuration, we designed an additional experiment where the oocytes were matured either with or without roscovitine for 36h.

As the results showed, no significant differences were found for any of the variables analyzed. Furthermore, the putative embryo rate reached 70% once more. This fact indicated that early embryo development was affected with a 44-hour IVM period, regardless of the fact that an inhibitor, such as roscovitine, had been used or not. This was not observed in shorter IVM periods (i.e. 36h); where the rate of zygotes showing 2PM were higher than the remaining groups after ICSI.

After analyzing these results, the possibility that the failure of embryo development after ICSI was related to an inappropriate activation after the microinjection still remained to be investigated, as suggested by other research groups (Lai *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003; Nakai *et al.*, 2003; Probst *et al.*, 2003).

5.3 EFFECT OF InsP_3 INJECTION ON *IN VITRO* EMBRYO DEVELOPMENT.

With the previous ICSI results obtained throughout this study, we can affirm that the exogenous activation of the oocyte is not needed to obtain high percentages of putative embryos. The sperm stimulus is sufficient to both activate the oocyte, and initiate embryo development. However, given the low number of embryos reaching the blastocyst stage (although they were no lower than they were in other research groups), we posed the possibility that the activation was inadequate, and therefore, the oocyte was incapable of further embryo development for the blastocyst stage to be reached.

Inositol 1, 4, 5-triphosphate (InsP_3) is one of the oocyte activation messengers (Wu *et al.*, 2001). Its action mechanism consists of inducing an increase in calcium concentration from the endoplasmic reticulum (ER). Although the mechanism through which the sperm-oocyte binding promotes calcium oocyte oscillations is not altogether elucidated, it is known that an activation of phospholipase C is observed during the phosphoinositol activation pathway, which mediates in the PIP_2 hydrolysis to produce DAG and InsP_3 . InsP_3 then goes on to produce calcium liberation from the ER. In 1993, Miyazaky *et al.*, demonstrated the InsP_3 function during the fertilization process. They observed an InsP_3 liberation blocking when InsP_3 -R inhibitor antibodies were injected.

At first we thought that the calcium liberation produced by the sperm injection was not similar in either its duration and intensity to that produced during normal fertilization because, although an oocyte activation was produced, further embryo development was defective. So, we decided to continue with our third hypothesis: an attempt to increase oocyte activation through an InsP_3 injection together with sperm.

In vitro, Amano *et al.* (2004) used this molecule as a parthenogenetic oocyte activator in pigs. They demonstrated that the InsP_3 injection promotes oocyte activation, cleavage, and even blastocyst formation. This capacity could be positively related to the calcium increase produced by InsP_3 .

The blastocyst rate results obtained showed no improvement after the InsP_3 injection in comparison to the control group (sperm injected

without InsP_3). As far as we are aware, the InsP_3 injection together with sperm has not been used to improve ICSI performance in pigs. Nonetheless, Kurokawa and Fissore (2003) have demonstrated that ICSI fertilization modifies the start of calcium oscillations, and that it provokes a lower persistence and duration in these oscillations than during traditional IVF, this being the main cause of low embryo developmental capacity of ICSI zygotes in mice. The results could be explained as Barenzes *et al.* (2004) proposed, since we did not properly mimick the calcium oocyte dynamics after fertilization, which consists of sequential activation and inhibition function series. These authors achieved mice offspring (67%) after the oocytes underwent 24 electric pulses every 8 minutes for three hours, that corresponded to the 24 calcium oscillations provoked through the intracellular calcium release. Possibly, if we had sequentially injected the InsP_3 into either the oocyte or the medium in our study, we would have seen some improvement. However, we cannot make a categorical interpretation of our results due to the low blastocyst number obtained in this experiment. In 2001, Lai *et al.* obtained a 30% blastocyst rate when electrical activation was employed, and only a 4.6% rate was obtained without this artificial activation, which matches our results.

The cleavage rate was also similar between both groups of injected sperm (with or without InsP_3). However, differences were found among the sham groups; sham- InsP_3 displayed a higher cleavage rate than the sham-buffer group did, which reveals InsP_3 -oocyte activation. In all cases, the rates were lower than those obtained by Amano *et al.* (2004). We believe that differences could lie in the InsP_3 concentration used, as we always worked at concentrations below $500\mu\text{M}$. All in all, in our experiment we observed that the effect that sperm had on the cleavage was superior to the InsP_3 effect, indicating that sperm stimulus is sufficient to obtain cleavage rates that are similar to others groups which use activating agents.

Nevertheless, research has still to discover the information and knowledge in the void that exists between the sperm injection and the start-up of all the appropriate mechanisms that lead to the zygote becoming a blastocyst.

FURTHER RESEARCHES

FURTHER RESEARCHES

METODOLOGICAL NEWS

- This is the first study comparing a sequence of employment of two culture media post-ICSI to identify its effect on the final ICSI yield.
- Another new procedure is the use of a two steps in vitro maturation system, first step with a meiotic inhibitor, in which the intracellular GSH content and fertilization ICSI parameters were assessed.
- It is the first study to assess InsP_3 injection together with sperm in pigs.

FURTHER RESEARCHES

Further researches should be directed to improve the embryo culture media through cellular cocultures (oviductal and endometrial cells) or through modifications in their composition. An important effect that should be studied is the effect of the oviductins on the oocyte and further embryo development.

It would be interesting to evaluate different InsP_3 concentrations and times and analyse the intracellular calcium oscillations through intracellular calcium measurements. These ICSI oscillation patterns might be compared with IVF patterns and we could be able to explain the low development of ICSI zygotes.

Finally, we could study microtubular and microfilament system after ICSI in order to detect if they are altered. In this case, part of the low developmental ICSI capacity will be explained.

CONCLUSIONS

7

CONCLUSIONS

1. ICSI derived pig zygotes achieve rates of two cells stage at 22h in higher proportion if they are cultured 6 or 20 hours previously in TALP medium than if they are directly transferred to NCSU-23 medium.
2. The culture of pig oocytes in 50 μ M roscovitine during 22 hours inhibits meiosis and increases intracellular glutathione content. This is a reversible effect after the in vitro maturation procedure and it increases the rate of two cells stage embryos after ICSI.
3. ICSI derived zygotes are able to establish pregnancies when they are transferred into female receptors nevertheless if they are treated or not with roscovitine.
4. A 36 hours period of in vitro maturation with or without roscovitine increases the putative embryos rate at 22h post-injection.
5. The inositol triphosphate injection together with the sperm does not increase the final ICSI performance in pigs.