2. MATERIAL Y MÉTODOS

En este apartado se describe la metodología seguida en el trabajo y los materiales utilizados. En referencia a los reactivos empleados, la mayoría fueron adquiridos en *Sigma-Aldrich Química* (Madrid, España), por lo tanto sólo se hará mención expresa de la procedencia en caso contrario.

2.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

La recogida del material biológico utilizado se realizó a partir de diferentes fuentes, según el tipo de material y la especie animal. Mención aparte merecen las muestras biológicas humanas, para cual se disponía del permiso de la Comisión Nacional de Reproducción Asistida.

2.1.1. Obtención de espermatozoides

2.1.1.1. Espermatozoides porcinos

Las muestras de espermatozoides porcinos proceden de verracos de fertilidad, del centro de inseminación artificial de la granja Lo Navarro de Murcia, S.A. El semen se obtuvo mediante el método manual, recogiendo la fracción rica del eyaculado. A continuación, en el laboratorio del centro de inseminación el semen se diluyó 1:1 en BTS (*Beltsville Thawing Solution*) y se trasladó, protegido de la luz, hasta el laboratorio de la Facultad de Veterinaria de Murcia.

2.1.1.2. Espermatozoides bovinos

Los espermatozoides de toro utilizados procedían de dosis seminales congeladas de machos adultos de fertilidad comprobada, de la raza autóctona "Asturiana de los Valles" cedidas por la Asociación de Criadores (ASEAVA, Gijón). El semen se conservó en nitrógeno líquido (-196ºC) en pajuelas de 0'5 ml en el laboratorio hasta su uso.

2.1.1.3. Espermatozoides humanos

Las muestras de espermatozoides humanos proceden de pacientes del centro IVI-Murcia con problemas de fertilidad (que llamaremos muestras "paciente"). Además se obtuvieron muestras de voluntarios de fertilidad probada (que llamaremos muestras "donante"). En ambos casos los hombres dieron previamente su consentimiento para el uso de dichas muestras. Además la Comisión Nacional de Reproducción Asistida, autorizó el uso de muestras de semen humano para los fines concretos de esta investigación, de acuerdo a la legislación vigente.

Las muestras se obtuvieron mediante masturbación, después de un período de abstinencia sexual de entre 3 a 5 días. Tras la recogida del eyaculado en recipiente estéril, se dejó en estufa a 37ºC entre 30 y 60 minutos para permitir su licuefacción y a continuación se realizó la capacitación.

2.1.2. Obtención de ovocitos

2.1.2.1. Ovocitos bovinos inmaduros

Los ovarios bovinos proceden de terneras con edades comprendidas entre 9 y 18 meses de edad, sacrificadas en el matadero Merca Murcia (El Palmar, Murcia) se transportaron en contenedor isotermo hasta el laboratorio durante la hora siguiente al sacrificio. Una vez en el laboratorio, los ovarios se lavaron en solución salina y los folículos mayores de 6 mm de diámetro se aspiraron y su contenido se descartó antes de comenzar a seccionar los demás folículos.

A continuación los folículos de entre 2 y 6 mm de diámetro se seccionaron con el uso de un bisturí, realizando incisiones paralelas en toda la superficie del ovario. El contenido se recogió en un vaso de precipitados que previamente contenía medio de recogida (OCM). Posteriormente se procedió al filtrado del

contenido mediante un sistema “Millipore” (**Figura 5**), que dispone de un filtro de “nylon” de 80µm diámetro de poro que permite el paso del fluido folicular y los restos celulares de menor tamaño, quedando retenidos los ovocitos cuyo diámetro aproximado es de 120µm. Se realizaron dos lavados añadiendo OCM limpio y a continuación se volcó el contenido en placas de Petri para seleccionar los ovocitos, utilizando un estereomicroscopio Nikon (modelo SMZ-10 A). Se seleccionaron aquellos ovocitos que estuban rodeados por varias capas compactas de células del *cumulus oophorus* y que mostraban un citoplasma homogéneo.

Figura 5. Sistema de filtrado para recogida de ovocitos bovinos.

2.1.2.2. Ovocitos porcinos inmaduros

Los ovarios porcinos proceden de cerdas prepúberes sacrificadas en el matadero El Pozo (Alhama de Murcia) y se transportaron en contenedor isotermo tras el sacrificio hasta el laboratorio.

Los ovarios se lavaron en una solución de cetrimida (Bromuro de hexadecil-trimetailamonio)y posteriormente en solución salina atemperada. Los ovocitos se obtuvieron seccionando con hoja de bisturí, los folículos ováricos cuyo diámetro oscilaba entre 3 y 6 mm. El contenido se mezcló con PBS y se dejó sedimentar en tubos cónicos. Una vez eliminado el sobrenadante, el sedimento se diluyó de nuevo con PBS limpio. Con ayuda del esteromicroscopio se seleccionaron los ovocitos que presentaban un citoplasma homogéneo y estaban rodeados de varias capas de células del *cumulus oophorus* con aspecto compacto y uniforme.

En ambas especies, porcino y bovino, los ovocitos seleccionados se aspiraron con una pipeta Pasteur adelgazada, de diámetro superior al de los complejos cúmulos-ovocito (COC´s) y se colocaron en una placa con PBS. Posteriormente se realizaron dos lavados con el medio de maduración correspondiente en cada caso antes de transferirlos a la placa de maduración.

2.1.2.3. Ovocitos ovulados (oviductales)

Con la finalidad de obtener ovocitos porcinos y bovinos ovulados se recogieron de matadero genitales de estas hembras en los que se observó que los ovarios presentaban puntos de ovulación recientes y se transportaron en un contenedor isotermo hasta el laboratorio. Allí, se aislaron los oviductos y se realizó un lavado de los mismos con PBS introduciéndolo con una jeringa a nivel de la unión útero-tubárica y recogiéndolo por el otro extremo, en la zona del infundíbulo (**Figura 6**). El contenido se observó en el estereomicroscopio y se obtuvieron los ovocitos que había. Con este método se obtuvieron ovocitos ovulados *in vivo* y que habían estado en contacto con las secreciones del oviducto, desde su ovulación hasta la recogida.

FIGURA 6. OBTENCIÓN OVOCITOS MADURADOS IN VIVO

2.1.2.4. Ovocitos madurados *in vivo* (foliculares)

Para obtener ovocitos madurados *in vivo*, sin necesidad de intervenir quirúrgicamente a los animales para este fin, se obtuvieron ovocitos de folículos preovulatorios, a partir de ovarios de porcino y bovino obtenidos de matadero. Se consideraron folículos preovulatorios aquellos que presentaban un diámetro aproximado de 15mm o superior en el caso de la vaca (Vasconcelos y cols. 1999) y próximo a los 10mm en el caso de la cerda (Conley y cols. 1994).

Los folículos seleccionados se aspiraron mediante una jeringa con aguja de calibre 18Ga. A continuación el contenido folicular se colocó en una placa y se observó en el estereomicroscopio y se localizaron los ovocitos.

2.1.3. Obtención de fluido oviductal

Los oviductos se obtuvieron a partir de genitales de terneras entre 9 y 18 meses de edad sacrificadas en matadero. Los ovarios junto a los oviductos obtenidos en matadero, fueron transportados en seco en un contenedor isotermo hasta su llegada al laboratorio donde se colocaron en un baño de hielo.

Una vez en el laboratorio los oviductos se separaron del ovario y se diseccionaron eliminando el mesosálpinx que los rodeaba, utilizando tijeras y pinzas. Una vez diseccionados, se procedió a la recogida del fluido existente en la luz del oviducto, entre dos personas, utilizando una pipeta automática de 200 µl (**Figura 7**).

A continuación el fluido obtenido se depositó en tubos pequeños y se centrifugó durante 10 minutos a 7000*g*. Se aspiró el sobrenadante y se congeló inmediatamente a –20º C.

FIGURA 7. OBTENCIÓN DE FLUIDO OVIDUCTAL

2.2. MEDIOS DE TRANSPORTE, LAVADO y RECOGIDA DE LOS GAMETOS

2.2.1. Medio de transporte de los ovarios

El medio utilizado para el transporte de los ovarios, desde el matadero hasta los laboratorios de Fisiología Veterinaria de la Universidad de Murcia, en ambas especies, fue solución salina fisiológica (SSF) con 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

2.2.2. Medio de lavado de los ovarios

En el caso de ovarios de vacas se utilizó solución salina fisiológica (SSF) para su lavado. Para los ovarios de cerda, se utilizó solución de cetrimida al 0'04% (w/v) y SSF. En ambos casos el lavado de los ovarios se realizó inmediatamente tras la llegada al laboratorio.

2.2.3. Medio de recogida de ovocitos de vaca (OCM)

El medio de recogida utilizado fue el TCM-199 modificado con sales de Hanks, L-Glutamina y rojo fenol, al que se le añadió bicarbonato sódico y Hepes, ajustando el pH a 7'4 (ver cuadro anexo). El día de su uso fue suplementado con suero fetal bovino (SFB), glutamina y antibióticos (Edwards y Hansen, 1996). El SFB fue suministrado por "Biological Industries" (Beitz Haemek, Israel).

MEDIO DE RECOGIDA DE OVOCITOS DE VACA (OCM)	
COMPONENTES	**CONCENTRACIÓN**
M199 modificado con sales de Hanks, L-glutamina y rojo fenol (M-0393)	10’6 mg/L
$NaHCO_3$	4’2 mM
Hepes	10 mM
Suero fetal bovino	2 %
Glutamina	2 mM
Penicilina	10.000 UI/ml
Estreptomicina	10.000 UI/ml

2.2.4. Medio de recogida de ovocitos de cerda

El medio utilizado fue el Tampón Fosfato Salino de *Dubelcco* modificado (PBS) suplementado con 1 mg/ml de alcohol polivinílico (PVA) y 0’005 mg/l de rojo fenol como indicador de pH. Además, este medio fue utilizado para realizar lavados de los ovocitos y para su manejo.

2.2.5. Medios de dilución de dosis seminales

El medio utilizado para la dilución de las dosis seminales de espermatozoides porcinos fue BTS (*Beltsville Thawing Solution;* Pursel y Johnson, 1975).

Diluyente BTS (*Beltsville Thawing Solution*)	
COMPONENTES	**CONCENTRACIÓN**
Glucosa	0’0002 mM
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	3’36 mM
$NaHCO_3$	15 mM
Citrato-$Na_3 \cdot 2H_2O$	20 mM
KCl	5 mM

2.3. MEDIOS DE CULTIVO (MADURACIÓN Y FIV)

Algunos de los medios de cultivo utilizados fueron elaborados en el laboratorio tal y como se indica a continuación. En estos casos se prepararon usando agua ultrapura (Milli-Q). A continuación, se esterilizaron por filtración mediante filtro de membrana con diámetro de 0’22 ì m en cabina de flujo laminar y se conservaron en frigorífico a 4º C el tiempo indicado para cada caso.

2.3.1. Medios de maduración *in* vitro (MIV) de ovocitos

El medio de MIV de ovocitos bovinos utilizado fue TCM-199 modificado con sales de Earle, L-Glutamina y rojo fenol, al que se le añadió bicarbonato y se ajustó el pH a 7’35. Cuatro horas antes de su utilización se le adicionó L-glutamina, piruvato de sodio, SFB, gentamicina, hCG (Chorulon, Intervet Internacional B.V., Boxmeer, Holanda) y PMSG (Foligon, Intervet Internacional B.V., Boxmeer, Holanda), y se equilibró en cámara de cultivo con atmósfera humidificada a 38’5º C y 5% de CO_2 (Edwards y Hansen, 1996).

MEDIO DE MADURACIÓN *IN* VITRO DE OVOCITOS BOVINOS (OMM)	
COMPONENTES	**CONCENTRACIÓN**
M199 con L-Glutamina y sales de Earle´s	9’5 mg/L
$NaHCO_3$	26’2 mM
L-Glutamina	2 mM
Piruvato sódico	0’2 mM
Suero Fetal Bovino	10 %
Gentamicina	50 µg/ml
FSH	10 UI/ml
LH	10 UI/ml

Para la MIV de ovocitos porcinos se empleó el medio NCSU-37. Se preparó una solución “stock” que se conservó en condiciones estériles a 4°C durante un máximo de dos semanas. En el momento de su uso, se suplementó tal y como describieron Funahashi y cols. (1997) y como se refleja a continuación.

MEDIO DE MADURACIÓN DE OVOCITOS PORCINOS (NCSU-37)	
COMPONENTES	**CONCENTRACIÓN**
NaCl	108’73 mM
$NaHCO_3$	25’07 mM
KCl	4’78 mM
KH2PO4	1’19 mM
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1’19 mM
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1’70 mM
Glucosa	5’55 mM
D-Sorbitol	12’00 mM
Penicilina G sódica	0’18 mM
Estreptomicina	39’00 UI/ml

SUPLEMENTO AL MEDIO DE MADURACIÓN DE OVOCITOS DE CERDA (NCSU-37)	
COMPONENTES	**CONCENTRACIÓN**
Cisteína	0’57 mM
â-mercaptoetanol	50’00 ì M
Insulina	5’00 mg/l
dbAMPc	1’00 mM
Fluido folicular porcino	10% (v/v)
PMSG	10 UI/ml
hCG	10 UI/ml

El fluido folicular porcino (PFF) es un fluido biológico que *in vivo* ocupa el interior del folículo ovárico donde se aloja el ovocito. Este fluido se forma mayoritariamente como un trasudado de plasma a través de la lámina basal del folículo y se va acumulando en el antro folicular. Está compuesto por proteínas propias del plasma y además posee esteroides y glucoproteínas sintetizadas por las células de la pared folicular. Los folículos antrales grandes, contienen concentraciones altas de 17β-estradiol en la fase folicular y de progesterona en los momentos próximos a la ovulación (Hafez, 2000).

El PFF utilizado se obtuvo mediante aspiración con jeringa de los folículos presentes en los ovarios obtenidos de matadero. Posteriormente, el fluido se centrifugó a 4ºC durante 30 minutos a 3000*g* y se recogió el sobrenadante. A continuación se filtró a través de filtros de membrana de 0’2µm y se congeló hasta su uso a –20ºC.

2.3.2. Medios de FIV

El medio de FIV bovina utilizado fue el FIV-TALP. Inicialmente se preparó el medio "FIV-stock" ajustado a un pH de 7'3, el cual se mantuvo en frigorífico a 4ºC en condiciones estériles hasta 15 días. Previo a su uso, el "FIV-stock" se suplementó con BSA, piruvato de sodio, heparina y antibiótico como lo describen Parrish y cols. (1988), pasando a denominarlo "FIV-TALP". Se equilibró durante 24 horas en cámara de cultivo con atmósfera humidificada a 38'5ºC y 5% de CO_2. Para la fecundación, 30 minutos antes, se añadieron 50 µl/ml de la mezcla epinefrina-hipotaurina-penicilamina (PHE). La solución final de PHE que se utilizó se preparó a partir de la mezcla de las soluciones intermedias (A, B, C y D), cuya composición de cada una de ellas se indica en la tabla correspondiente y PBS.

MEDIO DE FECUNDACIÓN DE OVOCITOS DE VACA (FIV-STOCK)

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
NaCl	114 mM
KCl	3'2 mM
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0'3 mM
Ácido láctico	10 mM
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2 mM
$NaHCO_3$	25 mM
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0'5 mM

PHE	
SOLUCIÓN A (10 ml)	
COMPONENTES	**CONCENTRACIÓN**
Solución salina	10 ml
Hipotaurina	1 mM
SOLUCIÓN B (10 ml)	
COMPONENTES	**CONCENTRACIÓN**
Solución salina	10 ml
Penicilamina	2 mM
SOLUCIÓN C (50 ml)	
COMPONENTES	**CONCENTRACIÓN**
Ácido láctico	29’43 mM
Meta bisulfito sódico	5’29 mM
PBS	50 ml
SOLUCIÓN D (40 ml)	
COMPONENTES	**CONCENTRACIÓN**
Solución C	40 ml
Epinefrina	1’83 mg
SOLUCIÓN FINAL (40 ml)	
COMPONENTES	**VOLUMEN**
Solución A	10 ml
Solución B	10 ml
Solución D	4 ml
PBS	16 ml

Para la FIV en la especie porcina, se utilizó el medio TALP con las modificaciones descritas por Rath y cols. (1999). Se preparó una solución "stock" denominada "TALPp stock" la cual se conservó bajo condiciones estériles a 4°C durante un máximo de dos semanas.

MEDIO DE FECUNDACIÓN PORCINA (TALPp stock)	
COMPONENTES	**CONCENTRACIÓN**
NaCl	114'06 mM
$NaHCO_3$	25'07 mM
KCl	3'20 mM
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0'35 mM
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0'50 mM
Lactato $Ca \cdot 5H_2O$	8'00 mM
Lactato sódico	10'00 mM
Glucosa	5'00 mM
Cafeína	2'00 mM
Sulfato de kanamicina	0'17 mM
Rojo fenol	0'003 mM
PVA	1 mg/ml

Previamente a su uso como medio de fecundación, el medio "TALPp 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. El pH se ajustó hasta 7'4 en un incubador al 5% de CO_2, 38'5°C y atmósfera saturada de humedad durante 5h antes de su uso.

2.3.3. Medios de manipulación y capacitación de espermatozoides

El medio utilizado para la manipulación y capacitación de los espermatozoides bovinos fue SPERM-TALP (Edwards y Hansen, 1996) cuyo "stock" se preparó tal y como se indica a continuación en la tabla (SPERM-TALP STOCK". En el momento de usarlo, se le añadió BSA, piruvato de sodio, heparina y antibióticos, denominándose SPERM-TALP. Para la capacitación se utilizó un gradiente de Percoll® al 90% y 45% en SPERM-TALP.

MEDIO DE MANIPULACIÓN Y CAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS	
SPERM-TALP STOCK	
COMPONENTES	**CONCENTRACIÓN**
NaCl	100 mM
KCl	3'2 mM
$NaH_2PO_4 \bullet H_2O$	0'3 mM
Ácido láctico	21'5 mM
CaCl2•2H2O	2 mM
$NaHCO_3$	25 mM
$MgCl_2 \bullet 6H_2O$	0'4 mM
Hepes	10 mM

MEDIO DE MANIPULACIÓN Y CAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS	
SPERM-TALP	
COMPONENTES	**CONCENTRACIÓN**
Sperm-TALP-Stock	
BSA	6 mg/ml
Piruvato sódico	1 mM
Heparina	1'75 UI/ml
Penicilina	10.000 UI/ml
Estreptomicina	10.000 UI/ml

PERCOLL®	
10X STOCK	
COMPONENTES	**CONCENTRACIÓN**
NaCl	799’96 mM
KCl	30’85 mM
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	28’98 mM
PERCOLL® 90% (200 ml)	
COMPONENTES	**CONCENTRACIÓN**
10 X Stock	20 ml
$NaHCO_3$	25 mM
Percoll	180’0 ml
$MgCL_2 \cdot 6H_2O$	0’395 mM
$CaCl_2$	1’95 mM
PERCOLL® 45% (10 ml)	
COMPONENTES	**CONCENTRACIÓN**
90% Percoll	5 ml
SPERM-TALP	5 ml

El medio de manipulación y capacitación de espermatozoides porcinos fue el TALP, suplementado del mismo modo que cuando se utilizó como medio de fecundación. Además se utilizó Percoll® (Amershan Biosciences, Upsala, Suecia) 90% y 45% preparado según la composición descrita en la tabla anterior, para la capacitación.

Para la manipulación y capacitación de espermatozoides humanos se utilizó "IVF Medicult" (Sydney, Australia) y "PureSperm Nidacom" (International AB, Suecia) cuya composición cualitativa declarada según el fabricante es la que se indica a continuación:

MEDIO DE CULTIVO PARA GAMETOS HUMANOS (IVF Medicult Ò)
Componentes declarados por el fabricante
Solución balanceada de Sales de *Earle* (EBSS) Albúmina sérica humana (HSA) Glucosa Bicarbonato sódico Penicilina 50.000 UI/l Estreptomicina 50 mg/l Rojo Fenol

MEDIO DE MANIPULACIÓN Y CAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS
PureSperm^{O}
Componentes declarados por el fabricante
Sílice recubierta de silano Hepes Cloruros de sodio, potasio y calcio EDTA Glucosa Agua

2.4. PROCESADO DE LOS ESPERMATOZOIDES

2.4.1. Procesado de espermatozoides porcinos

Para su capacitación se utilizó gradiente de Percoll® 90% y 45% (v/v), sobre el que se depositó un volumen de 0'5 ml del semen diluido previamente en BTS. Se centrifugó a 700*g* durante 30 minutos. Las células espermáticas que atravesaron el gradiente y se depositaron en el fondo fueron aspiradas y se lavaron en medio TALP mediante centrifugación a 100*g* durante 10 minutos. Tras la centrifugación los espermatozoides se resuspendieron de nuevo en medio TALP. Se utilizó una alícuota de esta suspensión para comprobar la motilidad y determinar la concentración espermática mediante recuento en hemocitómetro, para ajustarla a una concentración final de 10^5 células/ml.

2.4.2. Procesado de espermatozoides bovinos

Los espermatozoides bovinos se procesaron de manera similar a la descrita para los espermatozoides porcinos. Treinta minutos antes de la FIV se procedió a la descongelación de la pajuela de semen (0'5 ml) en baño a 38'5ºC durante 45 segundos y se depositó el semen de la pajuela en un gradiente de Percoll® 90% y 45% en SPERM-TALP, previamente atemperado (Parrish y cols., 1988). Seguidamente se centrifugó a 900*g* durante 10 minutos y se resuspendió el precipitado en 10 ml de medio "SPERM-TALP". Se centrifugó nuevamente a 300*g* durante 8 minutos y tras retirar el medio "SPERM-TALP", el precipitado obtenido se homogeneizó en 500 µl de medio FIV-TALP, previamente equilibrado. Se utilizó una alícuota de esta suspensión para comprobar la motilidad y determinar la concentración espermática mediante recuento en hemocitómetro. El resto de la suspensión se mantuvo en la cámara de cultivo mientras se calculó el volumen a utilizar de la suspensión espermática para alcanzar una concentración de 10^6 espermatozoides/ml que se utilizó para la FIV bovina.

2.4.3. Procesado de espermatozoides humanos

Un total de 60 muestras de semen humano fueron utilizadas. Tras la licuefacción de las muestras, se utilizó un gradiente de densidad para seleccionar los espermatozoides mótiles. El medio utilizado fue PureSperm® Nidacom (International AB, Suecia) a 90% y 45%. Una vez depositado 1 ml del semen sobre el gradiente se sometió a centrifugación a 300*g* durante 15minutos y se recuperó el sedimento, el cual se lavó con medio de cultivo (IVF Medicult® o TALP según la experiencia) a 600*g* durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en un volumen pequeño del medio utilizado. Una muestra alícuota de esta suspensión se utilizó para evaluar la motilidad y determinar la concentración espermática mediante recuento en hemocitómetro, mientras el resto de la suspensión se mantuvo en la cámara de cultivo mientras se calculó el volumen a utilizar de la suspensión espermática para alcanzar la concentración deseada en cada experiencia.

2.5. INDUCCIÓN Y VALORACIÓN DE LA RA

2.5.1. Inducción de RA con ionóforo de calcio

Para la inducción de la RA con inóforo de calcio, se utilizó el ionóforo A23187 (*Fluka,* Madrid, España). Los espermatozoides humanos previamente capacitados mediante gradientes de "PureSperm" fueron incubados con 5µM de ionóforo de calcio durante 3 horas a 38'5º C en medio de fecundación (TALP o IVF Medicult®, según los grupos). Finalmente, los espermatozoides fueron centrifugados y lavados dos veces con medio limpio para eliminar los restos de ionóforo y una alícuota de esta muestra se utilizó para valorar el estado del acrosoma. El resto de la muestra fue utilizado en los experimentos que correspondían.

2.5.2. Inducción de RA con agonistas naturales.

Como agonistas naturales de la inducción de la RA en espermatozoides humanos se utilizaron progesterona y fluido folicular porcino. Los agonistas se añadieron al medio de fecundación, de forma separada. Las concentraciones utilizadas fueron 10µM de progesterona, mientras que el fluido folicular se añadió a razón del 2% en el medio.

2.5.3. Valoración de la RA

Para la valoración del estado del acrosoma de los espermatozoides humanos unidos a la ZP, se siguió el método descrito por Liu y Baker (1996) utilizado para espermatozoides humanos, cuya representación esquemática aparece en la **Figura 8**.

Tras la incubación con los ovocitos, los espermatozoides con una adhesión lábil se eliminan aspirando los ovocitos varias veces con una pipeta de cristal de diámetro amplio; posteriormente los espermatozoides que permanecen unidos de forma son despegados de la superficie de la ZP utilizando una pipeta de diámetro ligeramente inferior al diámetro del ovocito (aproximadamente 120 µm) en un pequeño volumen. Para su fijación se colocan sobre una pequeña área delimitada de un portaobjetos, dejando secar al aire y posteriormente se permeabiliza con metanol durante 30 minutos. Finalmente se realiza la tinción con la lectina PSA marcada con fluoresceína (FITC–PSA), a una concentración de 40µg/ml durante 20 minutos en estufa a 38’5ºC. Las muestras se montaron utilizando *DABCO* y cubreobjetos, procediendo inmediatamente a su evaluación en el microscopio de fluorescencia. Se realizó el recuento de 200 espermatozoides para cada uno de los pocillos donde se habían incubado los espermatozoides. El resultado obtenido se expresó como porcentaje de RA.

Para evaluar el estado del acrosoma tras la tinción, se siguieron los criterios descritos por Cross y cols. (1988), Cummins y cols. (1991) y Franken y cols. (2000). Se consideraron como espermatozoides con el acrosoma reaccionado aquellos que presentaban algunos de los siguientes patrones: i) presencia de una zona teñida diferencial en la region ecuatorial a modo de banda; ii) ausencia de tinción sobre la superficie completa de la cabeza espermática y iii) tinción a modo de parcheado sobre la región acrosomal (**Figura 9**).

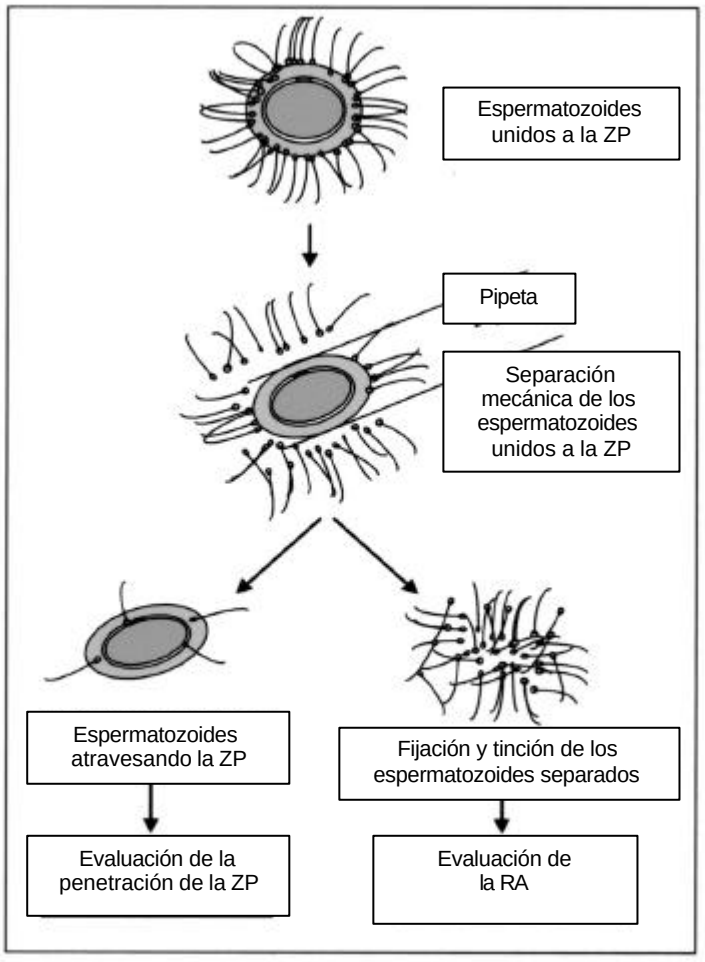

Figura 8. Representación esquemática de la técnica para determinar la inducción de la RA con ZP intacta. (Modificado de Liu y cols. 2004).

FIGURA 9. VALORACIÓN RA

2.6. MADURACIÓN *IN VITR0* DE OVOCITOS

2.6.1. MIV de ovocitos bovinos

La MIV de los ovocitos seleccionados se efectuó en placas de intercambio gaseoso de cuatro pocillos (Nunclon ^{TM}, Nunc, Dinamarca), en medio de maduración. La proporción de ovocitos/medio fue de 50/500µl. La maduración se realizó en atmósfera humidificada a 38'5º C y 5% de CO_2. En la vaca el tiempo de MIV de los ovocitos fue de 24 horas en OMM.

2.6.2. MIV de ovocitos porcinos

En la especie porcina, la MIV de los ovocitos se realizó en las mismas condiciones de incubación descritas para la especie bovina. El medio utilizado fue NCSU-37. Transcurridas las primeras 20-22 horas de maduración, los complejos *cumulus oophorus*-ovocito (CCO's) fueron transferidos a medio sin PMSG, hCG y dbAMPc donde se lavaron dos veces y se cultivaron durante otras 20-22 horas (Funahashi y Day, 1993).

2.6.3. Preincubación de ovocitos porcinos y bovinos en DTSP

El DTSP, o Di(N-succinimidil) 3,3'-ditiodipropionato Dithiobis(succinimidil propionato, (Fluka), fue diluido en DMSO a razón de 25 mg/ml y congelado a –20º C hasta su uso.

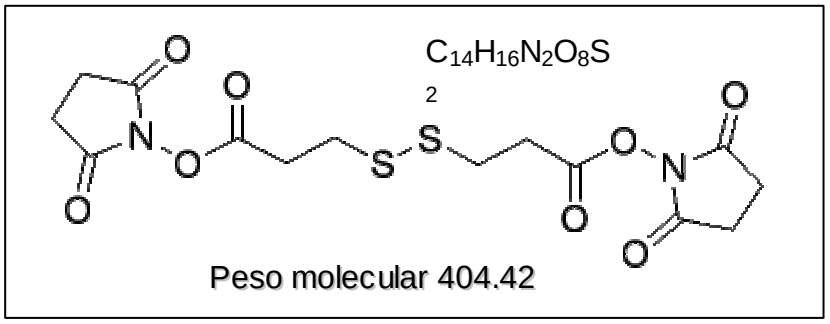

Figura 10. Estructura molecular del DTSP

Tras la maduración, y antes del momento de la fecundación, los ovocitos maduros se incubaron durante 30 minutos con DTSP a diferentes concentraciones según los grupos (0'06, 0'30 y 0'60 mg/ml) en medio de fecundación. Un grupo control con un volumen similar de DMSO se empleó como control en uno de los replicados. Posteriormente, los ovocitos fueron lavados en medio de fecundación limpio y se procedió a su fecundación.

2.6.4. Preincubación de ovocitos porcinos y bovinos en fluido oviductal

El fluido oviductal bovino congelado, obtenido previamente como se indicó en el apartado 2.1.3, se descongeló antes de su uso, manteniéndolo en el incubador para atemperarlo a 38'5ºC, antes de incubar los ovocitos en el mismo. A continuación se colocó una gota de 50 µl de fluido en el interior de uno de los pocillos de una placa de cultivo "Nunclon"® y se cubrió con aceite mineral para evitar su evaporación. Se aspiró una pequeña cantidad de fluido en la pipeta a utilizar y los ovocitos, previamente lavados en PBS se introdujeron con la menor cantidad de medio en las gotas de fluido correspondientes. La proporción entre el volumen de fluido oviductal y el número de ovocitos incubados en el mismo fue de 1µl:1ovocito. La placa se mantuvo en el incubador a 38'5ºC con 5% de CO_2 y atmósfera saturada de humedad durante 30 minutos. Una vez finalizado el tiempo de incubación, los ovocitos fueron lavados en PBS y utilizados para diferentes experimentos (tiempo de digestión con pronasa o FIV).

2.7. DIGESTIÓN DE LA ZP CON PRONASA

En todos los grupos de ovocitos sometidos al proceso de digestión de la ZP con pronasa, de forma previa a la digestión, se eliminaron las células del *cumulus oophorus* con una pipeta automática, para facilitar la observación de la ZP.

2.7.1. Tiempo de digestión de la ZP

Los ovocitos denudados se lavaron en PBS y se distribuyeron en grupos de 10, en microgotas de 50 µl de solución de pronasa de *Streptomyces griseus* (4 U/mg) al 0'5 % en PBS. Una vez que se introdujeron en la microgota de pronasa comenzó a medirse el tiempo. Se consideró como tiempo final, el momento en que se observó la digestión completa de la ZP (**Figura 11**). Los ovocitos se observaron bajo el esteromicroscopio a 20 y 40 aumentos de forma continua durante los primeros 10 minutos de contacto con la pronasa. En los casos en que trascurridos los 10 minutos no se observó la digestión de la ZP, se controlaron de forma regular cada minuto. Transcurrida 1 hora sin observar la digestión de la ZP la frecuencia con que se controlaron fue aproximadamente cada 5 minutos y transcurridas 3 horas se controló el estado de la ZP cada 15 minutos aproximadamente. En los casos en que la ZP fue disolviéndose muy lentamente, para determinar el momento de la digestión completa de la ZP se observaron bajo microscopio invertido con óptica *Hoffman* a 200 aumentos.

2.7.2. Obtención de ovocitos libres de ZP

La metodología seguida para este proceso fue similar a la descrita en el apartado anterior en cuanto al enzima utilizado y distribución de los grupos. Se prestó especial atención a retirar rápidamente de la pronasa los ovocitos en el momento que se observó la digestión completa de dicha estructura. Seguidamente se procedió a realizar tres lavados de los ovocitos en PBS atemperado con abundante volumen, con la finalidad de eliminar los posibles restos de la pronasa. A continuación se mantuvieron en PBS atemperado durante 10 minutos, antes de ser inseminados.

FIGURA 11. DIGESTIÓN ZP.

2.8. FECUNDACIÓN *IN* VITRO

2.8.1. FIV homóloga (porcina y bovina)

En la especie porcina, se depositaron 50 ovocitos en 250 µl de medio TALP y se añadieron 250µl de espermatozoides procesados con Percoll® según se ha descrito anteriormente. El tiempo de cocultivo de los ovocitos con los espermatozoides fue de 4 horas. Después de este tiempo, los ovocitos se lavaron muy bien mediante suscesivos pases a través de una pipeta Pasteur adelgazada para eliminar el exceso de espermatozoides adheridos a la ZP y se introdujeron en medio de fecundación TALP limpio hasta el día siguiente.

En la especie bovina, se retiró el medio de MIV del pocillo donde se encontraban los 50 ovocitos y rápidamente se añadieron 500µl del medio de FIV, donde además se añadieron 25µl de PHE y se incubó durante 30 minutos aproximadamente antes de proceder a la inseminación. En el momento de la inseminación, se añadió la cantidad de semen necesaria para alcanzar una concentración de 10^6 espermatozoides. El cocultivo se mantuvo durante 18-20 horas en incubador.

Una vez finalizado el periodo de cocultivo se procedió a la evaluación de la fecundación, mediante tinción y valoración en microscopio óptico de fluorescencia.

2.8.2. FIV homóloga y heteróloga con ovocitos libres de ZP

Para la FIV de ovocitos libres de ZP (en ambos casos) se utilizaron ovocitos porcinos de MIV, a los cuales se les eliminó la zona mediante digestión con pronasa, según lo descrito en el apartado 2.7.

Posteriormente, grupos de 50 ovocitos sin ZP fueron incubados en gotas de 40µl medio de FIV previamente equilibrado. Los espermatozoides porcinos o humanos fueron procesados según se describe en los apartados 2.4.1 y 2.4.3. Un volumen de 10µl del semen fue añadido a cada gota que contenía los ovocitos. Para los espermatozoides humanos, se utilizó inducción de la RA (ver apartado 2.5) en tres grupos utilizando ionóforo de Ca^{2+} o agonistas naturales (progesterona o fluido folicular), junto a un grupo de espermatozoides sin inducción de la RA.

A las 18-20 horas postinseminación, los ovocitos se lavaron en PBS y se sometieron a fijación y tinción según lo descrito en el apartado 2.8.5.

2.8.3. FIV heteróloga con ovocitos completos

Para la coincubación de gametos heterólogos, se utilizaron ovocitos porcinos de MIV, según la metodología descrita anteriormente. Las muestras de espermatozoides humanos, previamente capacitados y resuspendidos en medio de fecundación (IVF Medicult® o TALP) según se ha descrito, se incubaron en presencia o ausencia de ovocitos porcinos. El número de ovocitos fue de 15 por microgota de 50µl. La coincubación se mantuvo durante 2'5 horas a 38'5ºC en el incubador. Además, se incluyó un grupo en el que los espermatozoides humanos fueron coincubados con ovocitos porcinos madurados *in* vitro, a los que previamente se les había eliminado la ZP. Transcurrido el período de coincubación, se procedió a la valoración de la RA como se ha descrito en el apartado 2.5.3.

2.8.4. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

Los ovocitos utilizados para la ICSI, fueron ovocitos que tras 44 horas de maduración, se denudaron eliminando las células del *cumulus oophorus* mediante sucesivos pases de los COC's a través de una pipeta automática. Posteriormente,

se lavaron dos veces en PBS y se colocaron de forma individual en microgotas en las placas de microinyección.

Las placas utilizadas para realizar la ICSI fueron "*Falcon* petri dish 50x9mm" en las cuales se colocaron 3 gotas centrales de 4ìl de la solución de PBS suplementado con 10% suero fetal bovino y se añadió 1ìl de semen por gota, rodeadas por un número variable (10-14) de microgotas con un volumen de 4ìl de PBS y un ovocito por gota. Lasmicrogotas se cubrieron con aceite mineral para evitar su evaporación.

Para la microinyección se utilizó un microscopio invertido Nikon Diaphot 300 con óptica de Hoffman con los correspondientes micromanipuladores *TransferMan NK* (*Eppendorf*) y microinyectores *CellTram Air/CellTram Oil (Eppendorf).* Dicho microscopio contaba con una placa térmica que mantiene la temperatura a 38'5ºC. En primer lugar mediante una pipeta*Eppendorf Custom Tip sterile* (diámetro interno 8ìm) se seleccionó e inmovilizó un espermatozoide. A continuación se realizó la inmovilización del ovocito mediante la pipeta de sujeción *(Eppendorf Sterile VacuTips),* colocando el ovocito maduro con el corpúsculo polar en posición de 6 ó 12 horarias, con el fin de evitar causar daño en la placa metafásica. A continuación, se presionó con la pipeta de microinyección en la posición de las 3 horarias para atravesar la ZP. Para comprobar si el extremo de la pipeta estaba en el interior se aspiró citoplasma para confirmar que se había atravesado el oolema, y se inyectó el espermatozoide en el interior del citoplasma, retirando la pipeta de forma cuidadosa para evitar arrastrar al espermatozoide fuera del ovocito.

Tras la microinyección, los ovocitos se lavaron en TALP y se dejaron en el incubador a 38'5ºC con 5% de CO_2 y atmósfera saturada de humedad. La formación pronuclear se valoró a las 18-20 horas después de la microinyección.

2.8.5. Valoración de los resultados

Para evaluar los resultados de FIV, a las 18-20 horas post inseminación o post-ICSI los ovocitos se fijaron en glutaraldehído al 0'5% en PBS durante 30 minutos. A continuación los ovocitos se lavaron en PBS y se incubaron en oscuridad con una solución de Hoechst 33342 (1mg/ml) durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, los ovocitos se lavaron otra vez en PBS, y se adicionó sobre los mismos con la pipeta una pequeña cantidad de solución de montaje compuesta de Hoechst 1 mg/ml en PBS y glicerol en proporción 1:1 (v/v). A continuación, con una pipeta Pasteur se colocaron sobre un portaobjetos y sobre éste se colocó un cubreobjetos que se selló con esmalte. En el caso de los ovocitos sin ZP, este paso se realizó cuidadosamente para evitar la ruptura de la membrana plasmática del ovocito. Tras la tinción, los ovocitos fueron evaluados bajo microscopio de fluorescencia (*Leica DMR)* con filtro de fluorescencia para luz ultravioleta a 200-400 aumentos.

En la evaluación (**Figura 12**) se observó el estadio nuclear del ovocito (vesícula germinal, metafase, pronúcleo u otros) y la presencia/ausencia de espermatozoides y el estado en que se encontraban (espermatozoide compacto, descondensado, pronúcleo masculino, otros).

En el caso de la FIV heteróloga, se consideraron ovocitos no penetrados, aquellos que mostraron signos de no activación como la presencia de la placa metafásica, independientemente de la presencia de espermatozoides compactos en el ovocito.

Las variables estudiadas en el caso de la FIV homológa (porcino y bovino) fueron: porcentaje de ovocitos penetrados, número de espermatozoides por ovocito y porcentaje de ovocitos penetrados monospérmicos (los que tenían 2 pronúcleos o 1 pronúcleo y un espermatozoide descondensado). En el experimento de ICSI las variables analizadas fueron porcentaje de ovocitos activados y porcentaje de formación de pronúcleos masculino y femenino.

FIGURA 12 EVALUACION FIV

Parte a

FIGURA 12 EVALUACION FIV

Parte b

2.9. DISEÑO EXPERIMENTAL

2.9.1. Bloque I: Modificaciones en la ZP que afectan a la interacción espermatozoide-ovocito homóloga

2.9.1.1. Endurecimiento de la ZP porcina y bovina con agentes químicos

2.9.1.1.1. Efecto del DTSP sobre la resistencia de la ZP a la digestión con pronasa y sobre los resultados de FIV en la especie porcina

Experimento 1

Para comprobar el efecto del DTSP sobre el endurecimiento de la ZP porcina se utilizaron un total de 104 ovocitos porcinos. Un grupo de 50 ovocitos (grupo control) se mantuvo en el medio de FIV sin ningún tratamiento, mientras que el resto se incubó con DTSP según se ha descrito en la metodología. Se realizaron 4 replicados con 12-14 ovocitos por grupo y replicado. Se registró para cada ovocito el tiempo que tardó la ZP en ser digerida.

Experimento 2

Para evaluar el efecto del DTSP sobre los resultados de fecundación se emplearon grupos de 100 ovocitos, 50 de los cuales se utilizaron como control y los restantes fueron tratados con DTSP (0’60 mg/ml) antes de la fecundación. Se realizaron 3 replicados y se evaluó el porcentaje de penetración, el porcentaje de monospermia y el número medio de espermatozoides por ovocito penetrado.

Experimento 3

Con el fin de averiguar si el efecto del DTSP sobre los resultados de FIV era dosis dependiente, se utilizaron 3 concentraciones distintas del producto (0'06, 0'30 y 0'60 mg/ml) para el tratamiento de los ovocitos previo a la FIV, junto a un grupo control (sin el producto). Se emplearon aproximadamente 80 ovocitos por grupo, distribuidos en 4 replicados, con un total de 338 ovocitos utilizados. Tras la FIV se evaluó el porcentaje de penetración, el porcentaje de monospermia y el número medio de espermatozoides por ovocito penetrado.

2.9.1.1.2. Efecto del DTSP sobre la resistencia de la ZP a la digestión con pronasa y sobre los resultados de FIV en la especie bovina

Experimento 4

Con el objetivo de comprobar el efecto del DTSP sobre el endurecimiento de la ZP bovina se utilizaron un total de 144 ovocitos bovinos, distribuidos en dos grupos. Aproximadamente la mitad de los ovocitos (n=70, grupo control) se mantuvo en el medio de FIV sin ningún tratamiento, mientras que el resto (n=74) se incubó con DTSP según se ha descrito en la metodología. Se realizaron 4 replicados con un total de 15-20 ovocitos por grupo y se registró para cada ovocito el tiempo que tardó la ZP en ser digerida.

Experimento 5

Para evaluar el efecto del DTSP sobre los resultados de fecundación se emplearon un total de 138 ovocitos, repartidos en dos grupos. Aproximadamente la mitad se utilizaron como control y los restantes fueron tratados con DTSP (0'60 mg/ml) antes de la fecundación. Se realizaron 3 replicados y se evaluó el

porcentaje de penetración, el porcentaje de monospermia y el número medio de espermatozoides por ovocito penetrado.

2.9.1.2. Endurecimiento de la ZP porcina y bovina con agentes biológicos

2.9.1.2.1. Efecto del fluido oviductal sobre la resistencia a la digestión con pronasa y sobre los resultados de FIV en la especie porcina

Experimento 6

En este experimento se utilizaron un total de 139 ovocitos porcinos para comprobar el efecto del fluido oviductal sobre el endurecimiento de la ZP porcina. Para ello, se incubaron en grupos de 12-14 un total de 54 ovocitos madurados *in vitro* en fluido oviductal bovino, mientras que el grupo control (52 ovocitos) se mantuvo en TALP. Se realizaron 3 replicados y a continuación se registró para cada ovocito el tiempo que tardó la ZP en ser digerida utilizando pronasa al 0'5%.

Además, se obtuvieron ovocitos ovulados, tal y como se describe en el apartado 2.1.2.3 y se registró el tiempo necesario para digerir la ZP utilizando pronasa. También se obtuvieron ovocitos madurados in vivo de origen folicular, mediante aspiración de folículos preovulatorios.

Experimento 7

En este experimento se estudió si el efecto del fluido oviductal se mantenía constante a lo largo del tiempo, después de finalizada la incubación de los ovocitos en dicho fluido. Para ello se utilizaron ovocitos porcinos madurados *in* vitro distribuidos en 11 grupos. Inicialmente los ovocitos se dividieron según se incubaran o no en fluido oviductal. Los ovocitos no incubados correspondían al grupo control, con un total de 83 ovocitos, que se incubaron en medio TALP y se

evaluaron para registrar el tiempo de digestión con pronasa. El resto se incubaron en fluido oviductal durante 30 minutos. Tras la incubación, un grupo de ovocitos se utilizó para medir el tiempo de digestión en pronasa, mientras que el resto se incubó en medio TALP. A diferentes intervalos de tiempo de incubación en medio TALP (15, 40, 60, 80, 100, 120, 160, 240 y 300 minutos), se fueron tomando grupos de ovocitos y midiendo el tiempo de digestión con pronasa.

Experimento 8

Para evaluar el efecto del fluido oviductal sobre los resultados de fecundación porcina se utilizaron 304 ovocitos, repartidos en dos grupos. Aproximadamente la mitad se utilizaron como control y los restantes fueron incubados en fluido oviductal antes de la fecundación. Se realizó la fecundación en 4 replicados y se evaluaron los siguientes parámetros: porcentaje de penetración, porcentaje de monospermia y número medio de espermatozoides por ovocito penetrado, para cada uno de los grupos.

2.9.1.2.2. Efecto del fluido oviductal sobre la resistencia de la ZP a la digestión con pronasa en la especie bovina

Experimento 9

Un total de 121 ovocitos fueron utilizados en este experimento con el fin de comprobar el efecto del fluido oviductal sobre el endurecimiento de la ZP bovina. Para ello, se incubaron un total de 25 ovocitos madurados *in* vitro en fluido oviductal bovino, mientras que otro grupo (control) se mantuvieron en TALP. Se realizaron 3 replicados y a continuación se registró para cada ovocito el tiempo que tardó la ZP en ser digerida utilizando pronasa al 0’5%. Además, se obtuvieron ovocitos ovulados, tal y como se describe en el apartado 2.1.2.3 y se registró el tiempo necesario para digerir la ZP utilizando pronasa. También se obtuvieron ovocitos madurados in vivo (foliculares), mediante aspiración de folículos preovulatorios.

Experimento 10

En este experimento se estudió si el efecto del fluido oviductal se mantenía a lo largo del tiempo después de finalizada la incubación en dicho fluido. Para ello se utilizaron 458 ovocitos bovinos madurados *in* vitro distribuidos en 11 grupos. Del total, 36 ovocitos (grupo control) se incubaron en TALP, mientras el resto se incubó en fluido oviductal. Transcurridos los 30 minutos de incubación se registró el tiempo de digestión con pronasa para el grupo control y uno de los grupos incubados en fluido oviductal. Los restantes ovocitos se pasaron a medio TALP y a diferentes intervalos de tiempo (15, 40, 60, 80, 100, 120, 160, 240 y 300 minutos) se sacaron parte de ellos y se registró el tiempo necesario para la digestión de la ZP con pronasa.

2.9.2. Bloque II: Interacción espermatozoide-ovocito heteróloga: Diseño de un modelo para el desarrollo de un test de funcionalidad espermática

2.9.2.1. Estudio de la interacción espermatozoide humano-ovocito porcino a nivel de la ZP

Experimento 11

En este experimento se estudia la capacidad de los espermatozoides humanos de sufrir la RA tras la unión a la ZP porcina en dos medios de cultivo diferentes (TALP y *Medi-Cult ®Universal IVF*). Se utilizaron 3 muestras de semen humano que fueron incubadas utilizando los dos medios de cultivo para cada muestra. Todas las muestras se incubaron en presencia (grupos experimentales) de ovocitos porcinos madurados *in* vitro (15 ovocitos/ 50µl) y una parte alícuota de cada muestra se incubó sin ovocitos (grupos control). La RA fue evaluada en cada

uno de los grupos y el porcentaje de RA inducida en los grupos experimentales se calculó según la diferencia respecto a la RA espontánea observada en los grupos control.

Experimento 12

Utilizando el medio de incubación *Medi-Cult ®Universal IVF,* que es un medio de cultivo de uso habitual en clínicas de reproducción humana, se emplearon 12 muestras de semen humano para estudiar la capacidad de los espermatozoides de sufrir la RA tras la unión a la ZP porcina y observar si existían diferencias según las muestras seminales utilizadas. Además, se incluyó un grupo en el que las muestras de semen fueron coincubadas bajo las mismas condiciones, pero con ovocitos sin ZP. La incubación se realizó a una concentración de 2'5 x 10^6 espermatozoides/ml durante 2'5 horas. Se evaluó el estatus acrosomal de los espermatozoides adheridos al ovocito (ZP u oolema).

2.9.2.2. Estudio de la interacción espermatozoide humano-ovocito porcino a nivel de la membrana plasmática

Experimento 13

En este experimento se estudió la capacidad de los espermatozoides humanos para fusionarse con ovocitos porcinos madurados *in* vitro libres de ZP. Los ovocitos porcinos (aproximadamente 1800) sin ZP se coincubaron con 33 muestras de espermatozoides humanos; en 15 de ellas una parte de la muestra fue tratada con ionóforo de calcio (5μM), progesterona (10μM) o fluido folicular (2%) para inducir la RA y el resto se utilizó sin inducción de RA. Se utilizaron diferentes grupos control: i) ovocitos porcinos inseminados con espermatozoides porcinos,

ii) ovocitos porcinos libres de ZP inseminados con espermatozoides porcinos y

iii) ovocitos porcinos inseminados con espermatozoides humanos. Antes de la incubación, una cantidad alícuota de muestra de semen fue teñida con PSA-FITC y se evaluó el estatus acrosomal de los espermatozoides. Finalmente, tras la coincubación durante 18-20 horas, los ovocitos se fijaron y tiñeron con Hoechst 3342 para evaluar adhesión, penetración y presencia de espermatozoides descondensados en el ooplasma y estadio nuclear del ovocito. En la **figura 13** puede verse la representación esquemática de este experimento.

2.9.2.3. Estudio de la interacción espermatozoide humano-ovocito porcino a nivel del citoplasma

Experimento 14

El objetivo de este experimento consistió en investigar la capacidad de los espermatozoides humanos, procedentes de muestras de pacientes o donantes de fertilidad probada, microinyectados en un ovocito porcino madurado *in* vitro para descondensarse, transformarse en pronúcleo masculino y activar al ovocito tras la microinyección. Se emplearon 12 muestras de semen humano con las que se inyectaron aproximadamente 10 ovocitos porcinos por muestra. Tras la microinyección, los ovocitos se incubaron en medio TALP durante 18 horas. Transcurrido ese tiempo, se fijaron y tiñeron como se ha descrito en la metodología para evaluar el estado de la cabeza espermática y el estadio nuclear del ovocito.

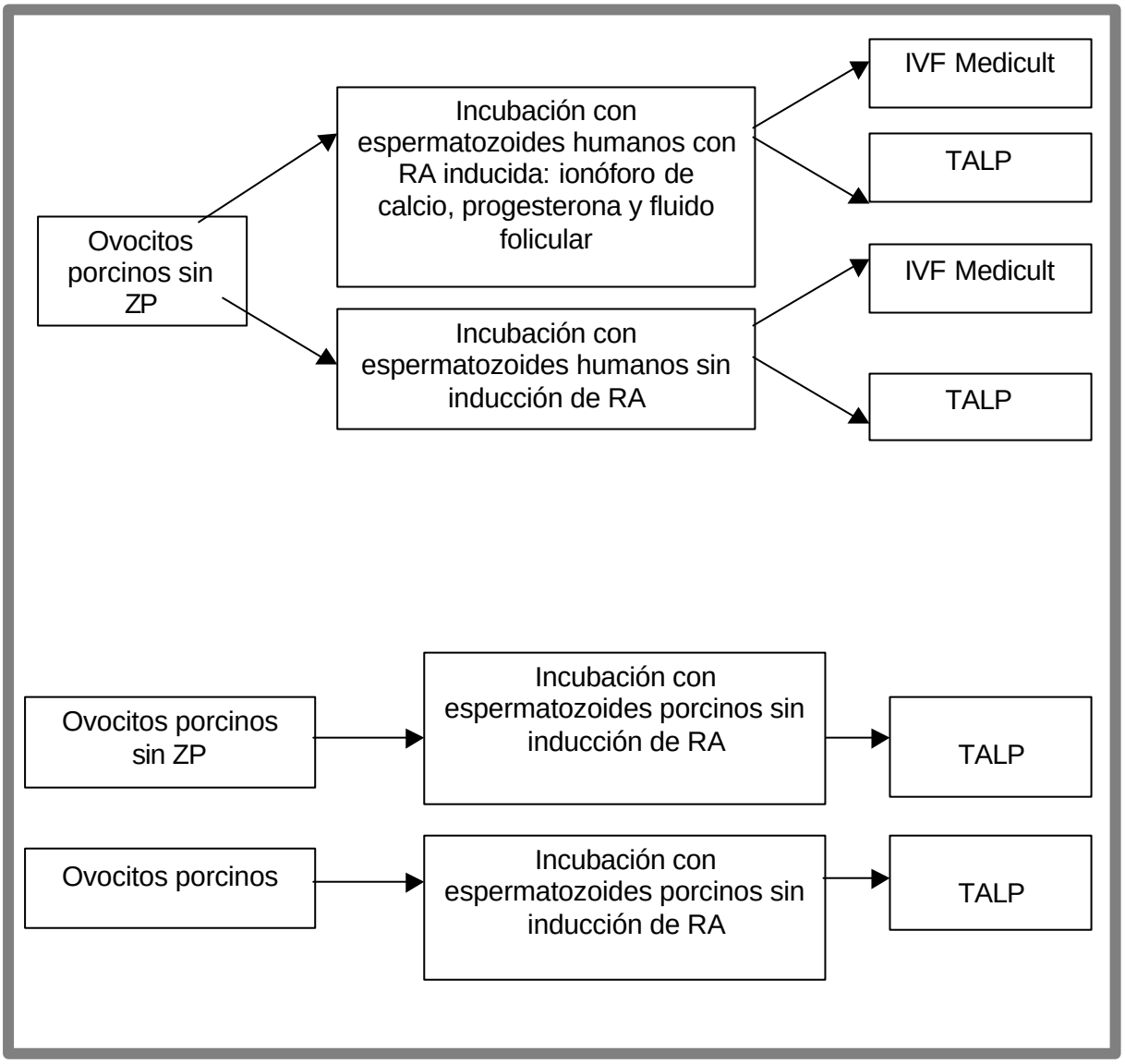

Figura 13. Representación esquemática del experimento 13.

2.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El programa utilizado para el análisis estadístico fue SPSS versión 11.5 para Windows.

Los resultados de las variables estudiadas (tiempo de digestión en pronasa, porcentaje penetración y de monospermia, número de espermatozoides por ovocito y porcentaje de RA), se expresan como medias ± error estándar de la media (SEM). Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Cuando este análisis reveló un efecto significativo los valores fueron comparados por el Test de *Tukey,* considerando como diferencias significativas aquellas que alcanzaron niveles de probabilidad $p<0'05$.

En las experiencias del 1 al 10, el efecto fijo fue el tratamiento a que se sometieron los ovocitos (control, DTSP, FO) o el origen de dichos ovocitos (inmaduros, MIV, oviductales, foliculares) y se estudiaron las variables: tiempo de digestión en pronasa, porcentaje de penetración y de monospermia, número de espermatozoides por ovocito.

Los resultados de la experiencia 13 no se sometieron a análisis estadístico porque son suficientemente descriptivos, teniendo en cuenta que la penetración fue del 0% en todos los grupos experimentales, mientras que en los dos grupos de control de FIV la penetración fue mayor del 85%, lo cual es indicativo de que el sistema de FIV funciona, mientras que en los grupos experimentales no hay fecundación.

Respecto al experimento 14 tampoco fue necesario hacer análisis estadístico de los datos, ya que los resultados aportaron información suficiente para demostrar que la ICSI heteróloga funciona y hay formación de PN masculino y femenino con todas las muestras (“donante” y “paciente”). A su vez se observa que sólo en las muestras procedentes de donantes de fertilidad probada hubo división, sin que se observe este hecho en ninguna de las muestras “paciente”.