



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA.
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



U N I V E R S I D A D
D E M U R C I A
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 Lcda. 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 papã, mamã, 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 Ràkel Romar por estar siempre a disposici3n, porque has sabido siempre escucharme y aconsejarme en todos los aspectos, por todos aquellos conocimientos científcos 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 elaboraci3n 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 colaboraci3n en la cirugía y realizaci3n 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 colaboraci3n. Por los sábados empleados desinteresadamente y por su ayuda incondicional en la preparaci3n de esta tesis.

A Charlie por su originalidad y la colaboraci3n prestada en la preparaci3n 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 Reproducci3n.

A la Fundaci3n Séneca por la financiaci3n económica prestada a través de la beca FPI concedida para la realizaci3n 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. Evita, Sim3n, 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 *IN VIVO* _____ 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 *IN VITRO* _____ 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 *IN VIVO* _____ 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 ovocitos tras 22h de cultivo en roscovitina	110
4.2.2	Progresión nuclear de los ovocitos madurados <i>in vitro</i> con premaduración en roscovitina	113
4.2.3	Efecto de la roscovitina sobre el contenido en glutatión de los ovocitos	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 ovocitos premadurados en roscovitina	118
4.2.7	Efecto de la premaduración con roscovitina en ovocitos porcinos madurados <i>in vitro</i> durante 36h.	119
4.3	EFFECTO 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 intracelullar 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