
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 estadíos nucleares. El porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadío 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

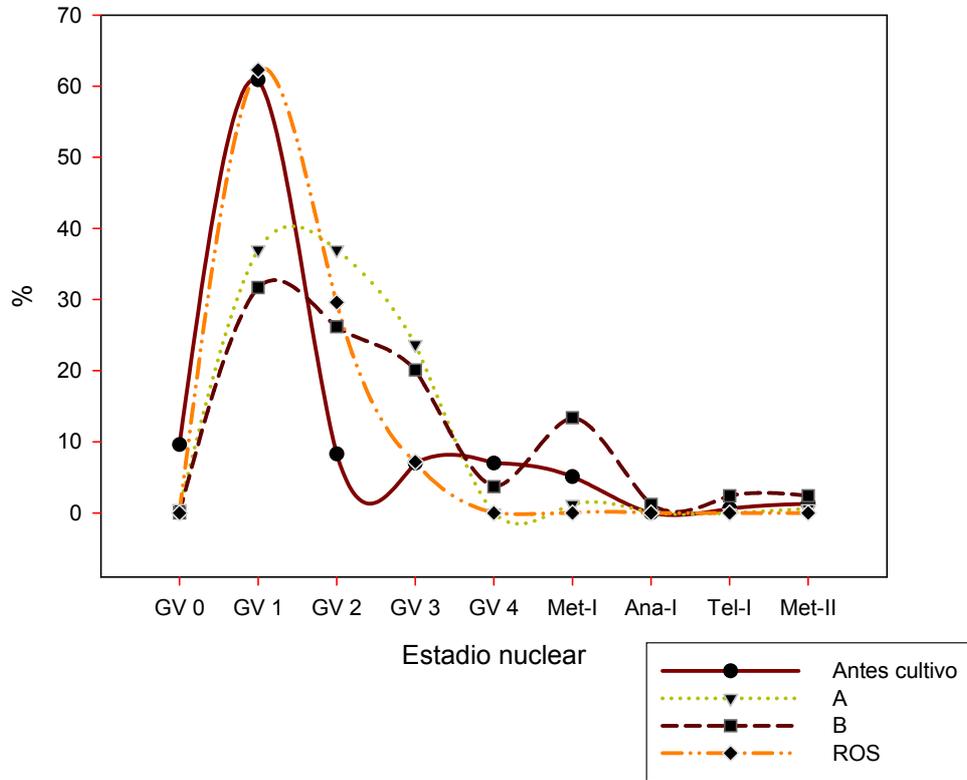
a, b; subíndices diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (p<0.05)

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

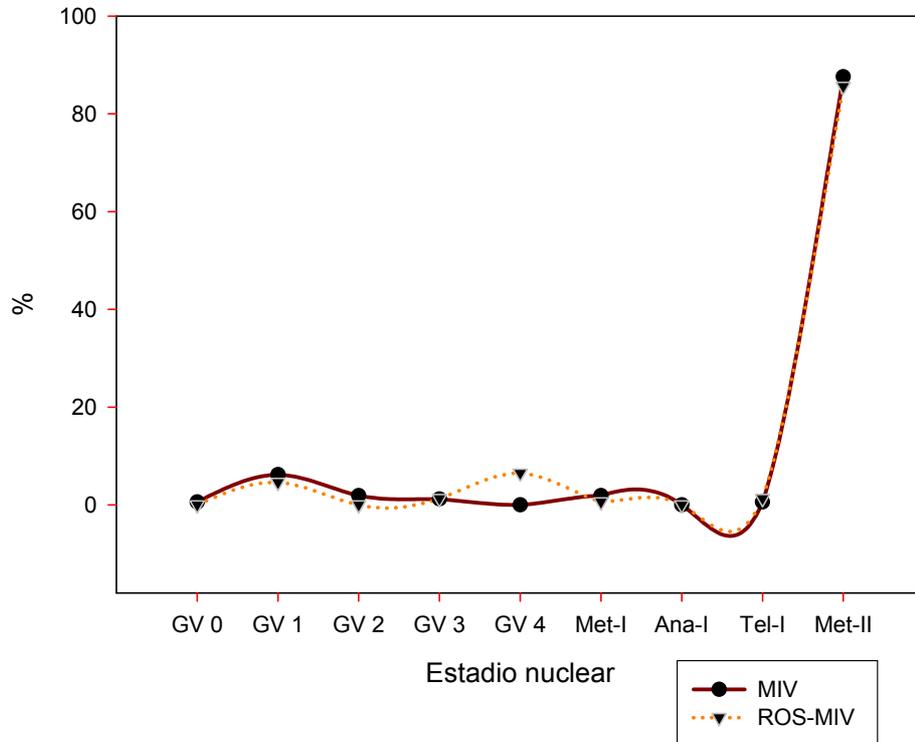
Los resultados muestran que después del período de maduración de 44h, los ovocitos pertenecientes al grupo ROS-MIV reanudan la meiosis y alcanzan el estadio de MII en los mismos niveles que el grupo MIV sin premaduración con roscovitina. Estos porcentajes oscilan alrededor del 85% (tabla 10 y figura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

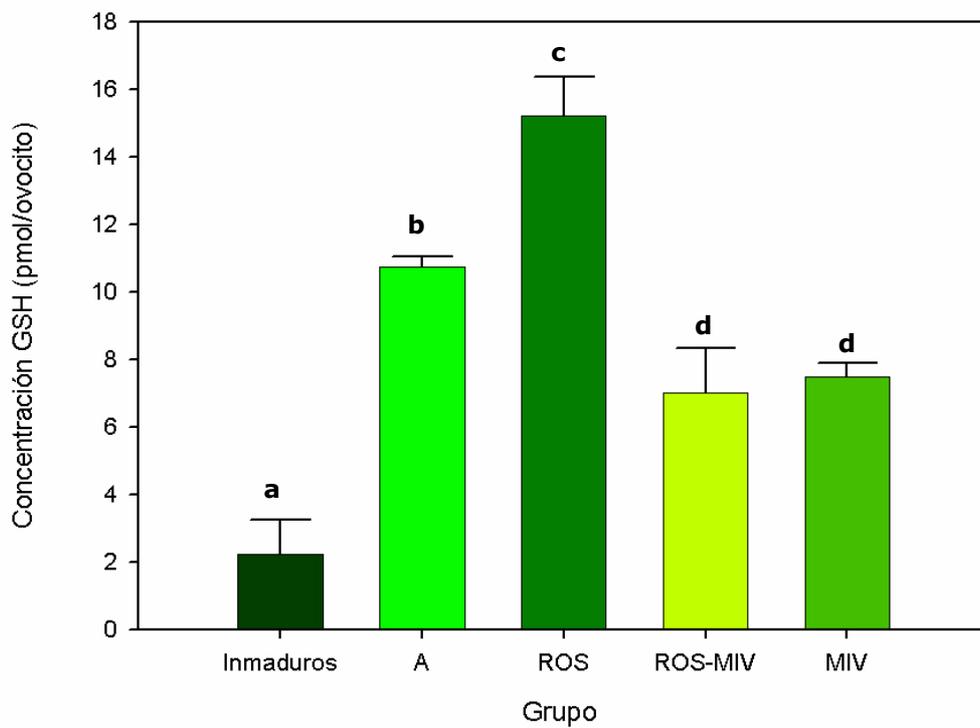


4.2.3. Efecto de la roscovitina sobre el contenido en GSH de los ovocitos

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 InsP₃. 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