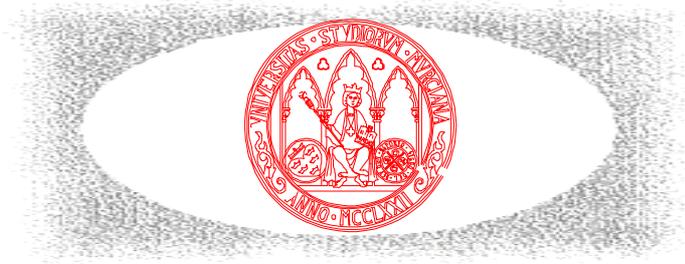


UNIVERSIDAD DE MURCIA



FACULTAD DE VETERINARIA

**INFLUENCIA DE DIFERENTES CONDICIONES DE
COCULTIVO SOBRE LA FECUNDACIÓN Y LA PRODUCCIÓN
IN VITRO DE EMBRIONES PORCINOS**

María Antonia Gil Corbalán
Murcia, 2001

*Este trabajo ha sido financiado por los proyectos
EUREKA EU-1713 y CICYT AGF98-0533*

*A mis padres,
por su amor, dedicación y sacrificio,
a ellos pertenecerá todo lo que soy o consiga*

*A Sergio,
por su paciencia y cariño*

A Emilio Martínez

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, los profesores Emilio Martínez García y Juan M^a Vázquez Rojas, de quienes he aprendido tanto y con quienes tan buenos ratos he pasado, por su ayuda, confianza y dedicación durante todos estos años.

Al profesor Jordi Roca Aleu, por su constante estímulo y sus valiosos consejos que me ayudaron siempre a superar las dificultades.

A los tres, por enseñarme a ver, a interpretar, a insistir, y al fin y al cabo por enseñarme a investigar.

A Xiomara Lucas, por confiar siempre en mí, por su apoyo diario y por la amistad que nos une después de estos años.

A Inmaculada Parrilla y Gloria Ribera, por estar siempre a mi lado.

A mis compañeras y amigas, Cristina Cuello, María Rodríguez, María Ruiz y Gema Carvajal, por su ayuda desinteresada e inestimable, su continuo ánimo y por todas las horas que hemos pasado juntas en el laboratorio.

A Olga Blanco, Silvia Martínez, M^a Dolores Ortega, Nuria García, Fernando Centurión, M^a José Sánchez, Jose Tornel y a todos los alumnos internos del departamento de Reproducción y Obstetricia, por estar siempre disponibles cuando los he necesitado.

Al Dr. Billy N. Day, por aceptarme en su equipo de investigación de Animal Sciences Center en la Universidad de Columbia-Missouri (Missouri, USA) y por el afecto demostrado durante los meses que he tenido el orgullo de trabajar a su lado. A su esposa Annabel por su aprecio y hospitalidad.

A Laly Abeydeera, por el tiempo dedicado y por lo mucho que me ha enseñado.

A las empresas Dalland Hybrid España y Castillo Larache por la disponibilidad de animales, sin la cual no podríamos haber realizado estas experiencias. Y a las industrias Fuertes-El Pozo S.A. por facilitarme el material biológico.

Al Ministerio de Educación y Cultura por la concesión de mi beca de Formación de Personal investigador.

A mis hermanas y a Angel, por no fallarme nunca y porque siempre me han animado aún con el poco tiempo que les he prestado durante estos años de trabajo.

A la familia Escobar, por su inestimable cariño y apoyo.

Al resto de mi familia y amigos, por estar siempre pendientes de mi sobre todo en los momentos en los que más los he necesitado.

A Lara, por esperarme siempre en la puerta, aunque tardase tres meses en llegar.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. Fecundación in vitro. Antecedentes	7
2.2. Maduración del ovocito	10
2.2.1. <u>Maduración in vivo</u>	10
2.2.2. <u>Maduración in vitro</u>	11
2.2.2.1. <i>Factores que influyen en la MIV</i>	13
2.2.2.1.1. Procedencia de los ovocitos.....	13
2.2.2.1.2. Efecto de las células foliculares.....	14
2.2.2.1.3. Efecto de la suplementación del medio de maduración.....	14
2.3. Penetración espermática	18
2.3.1. <u>Prevención de la polispermia in vivo</u>	18
2.3.1.1. <i>El tracto reproductivo femenino</i>	18
2.3.1.2. <i>La resupuesta directa de los ovocitos</i>	20
2.3.2. <u>Prevención de la polispermia in vitro</u>	20
2.3.2.1. <i>Respuesta de los ovocitos in vitro</i>	21
2.3.2.2. <i>Efecto de diferentes condiciones de cocultivo sobre la polispermia</i>	22
2.3.2.2.1. Fuente y preparación de los espermatozoides.....	22
2.3.2.2.2. Efecto de las células del cúmulus durante el cocultivo.....	23
2.3.2.2.3. Medios de cocultivo.....	24
2.3.2.2.4. Efecto del volumen de medio, de la concentración de espermatozoides y del número de ovocitos durante el cocultivo.....	26
2.3.2.2.5. Efecto de la duración de cocultivo.....	30
2.3.2.2.6. Preincubación de los espermatozoides con células oviductales.....	31
2.3.2.2.7. Preincubación de los espermatozoides con fluido folicular porcino.....	31
2.3.2.2.8. Adición al medio de cocultivo de otras sustancias.....	32
2.4. Cultivo de embriones in vitro	33

2.4.1. <u>Progresos en el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto.....</u>	34
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
3.1. Material.....	39
3.1.1. <u>Material animal.....</u>	39
3.1.2. <u>Reactivos químicos y suplementos.....</u>	39
3.1.3. <u>Condiciones de cultivo.....</u>	39
3.1.4. <u>Medios utilizados.....</u>	40
3.1.4.1. <i>Medio de transporte y lavado de ovarios (MT).....</i>	40
3.1.4.2. <i>Medio de lavado de ovocitos (MLO).....</i>	40
3.1.4.3. <i>Medio de maduración in vitro (MM).....</i>	41
3.1.4.4. <i>Medio de lavado de los espermatozoides (MLE).....</i>	42
3.1.4.5. <i>Medio de fecundación in vitro (MF).....</i>	42
3.1.4.6. <i>Medio de cultivo in vitro de embriones (MCE).....</i>	43
3.2. Métodos.....	44
3.2.1. <u>Criopreservación de los espermatozoides.....</u>	44
3.2.1.1. <i>Criopreservación en forma de píldoras (Método A).....</i>	44
3.2.1.2. <i>Criopreservación en forma de pajuelas (Método B).....</i>	46
3.2.2. <u>Obtención y maduración in vitro de los ovocitos.....</u>	47
3.2.3. <u>Fecundación in vitro.....</u>	48
3.2.4. <u>Cultivo in vitro de los embriones.....</u>	51
3.2.5. <u>Valoración de los parámetros de fecundación (PF).....</u>	51
3.2.6. <u>Valoración del desarrollo embrionario (DE).....</u>	55
3.2.7. <u>Tinción y conteo de espermatozoides adheridos a la zona pelúcida.....</u>	55
3.3. Diseño del trabajo experimental.....	59
3.3.1. <u>Experiencia 1: Efecto del volumen de cocultivo y del número de ovocitos durante el cocultivo sobre los parámetros de fecundación, utilizando una concentración constante de espermatozoides.....</u>	60

3.3.2. <u>Experiencia 2: Efecto del volumen de cocultivo y del número de ovocitos durante el cocultivo sobre los parámetros de fecundación y desarrollo embrionario, utilizando un ratio espermatozoides:ovocito de 2.000:1.....</u>	60
3.3.3. <u>Experiencia 3: Efecto de la presencia de células del cúmulus durante la fecundación in vitro sobre los parámetros de fecundación y desarrollo embrionario, utilizando distintos ratios espermatozoides:ovocito.....</u>	63
3.3.4. <u>Experiencia 4: Efecto del tiempo de contacto espermatozoides – ovocitos sobre los parámetros de fecundación y desarrollo embrionario.....</u>	63
3.4. Análisis estadístico.....	64
4. RESULTADOS.....	67
4.1. Experiencia 1: Efecto del volumen de cocultivo y del número de ovocitos durante el cocultivo sobre los parámetros de fecundación, utilizando una concentración constante de espermatozoides.....	67
4.2. Experiencia 2: Efecto del volumen de cocultivo y del número de ovocitos durante el cocultivo sobre los parámetros de fecundación y desarrollo embrionario, utilizando un ratio espermatozoides:ovocito de 2.000:1.....	72
4.3. Experiencia 3: Efecto de la presencia de células del cúmulus durante la fecundación in vitro sobre los parámetros de fecundación y desarrollo embrionario, utilizando distintos ratios espermatozoides:ovocito.....	77
4.4. Experiencia 4: Efecto del tiempo de contacto espermatozoides – ovocitos sobre los parámetros de fecundación y desarrollo embrionario.....	81
5. DISCUSIÓN.....	87
5.1. Efecto del volumen de medio, del número de ovocitos y del número de espermatozoides durante el cocultivo.....	87
5.1.1. <u>Con una concentración constante de espermatozoides/ml.....</u>	87
5.1.2. <u>Con un número constante de espermatozoides:ovocito.....</u>	89

5.2. Efecto de la presencia de las células del cúmulus durante la FIV.....	91
5.3. Efecto del tiempo de contacto espermatozoides-ovocitos.....	94
6. CONCLUSIONES.....	99
7. RESUMEN.....	101
8. SUMMARY.....	105
9. ABREVIATURAS.....	107
10. BIBLIOGRAFÍA.....	111

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años y para la mayoría de las especies domésticas de interés zootécnico, se han desarrollado diferentes métodos de maduración in vitro (MIV), fecundación in vitro (FIV) y cultivo in vitro de embriones (CIV). En la especie porcina, estas técnicas se encuentran todavía en fase experimental, si bien últimamente han evolucionado de forma espectacular.

Uno de los objetivos de la producción in vitro de embriones en la especie porcina es el de utilizar un gran número de folículos ováricos, recolectados a partir de ovarios de hembras prepuberales, con la finalidad de obtener una gran cantidad de embriones a bajo costo. Estos embriones podrían utilizarse para manipulación in vitro (fundamental para la producción de cerdos transgénicos) o para la obtención de descendencia de sexo conocido a partir de espermatozoides X/Y separados por citometría de flujo (Rath y cols., 1993), donde el rendimiento de la separación es escaso comparado con el número mínimo de espermatozoides necesario para asegurar una gestación tras la inseminación artificial (Martínez, 1995; Martínez y cols., 1999). Los sistemas de MIV/FIV/CIV también pueden aplicarse a investigaciones básicas sobre el desarrollo embrionario, la mortalidad embrionaria temprana o sobre diferentes aspectos de la micromanipulación embrionaria o la criopreservación de gametos (Day y Funahashi, 1996). Además, la FIV puede ser utilizada como un test de fertilidad para evaluar la capacidad fecundante de los espermatozoides de diferentes verracos, al haber sido demostrado un efecto individual en la penetrabilidad de los espermatozoides (Martínez y cols., 1993, 1998).

Por tanto, parece obvio el enorme interés económico que presentan estas técnicas en el campo de la producción porcina. Sin embargo, aunque la producción in vitro de embriones a partir de ovocitos madurados, fecundados y cultivados in vitro es hoy una realidad, el rendimiento de estas técnicas es todavía inapropiado para obtener los beneficios anteriormente mencionados.

Cronológicamente, los primeros intentos de FIV en la especie porcina fueron realizados por Harms y Smith (1970), Iritani y cols., (1978) y Pavlok (1981), pero no es hasta 1986 cuando Cheng y cols., (1986) obtienen las primeras camadas nacidas tras FIV

de ovocitos madurados in vivo. A partir de entonces, se ha conseguido producir embriones in vitro en varios laboratorios y se ha obtenido descendencia tras la transferencia de embriones a cerdas receptoras, aunque la efectividad de esta metodología es muy limitada, habiéndose alcanzado porcentajes de blastocistos no superiores al 40% (revisado por Funahashi y Day, 1997).

Durante los últimos años los distintos grupos de investigación han estado centrados en el perfeccionamiento de cada una de las técnicas implicadas, principalmente en los protocolos de MIV y FIV, con el fin de elevar el número de embriones viables obtenidos in vitro. Particular atención ha sido puesta en resolver los históricos problemas de la reducida incidencia de la formación del pronúcleo masculino (PNM) y la elevada polispermia (revisado por Niwa, 1993; Prather y Day, 1998).

Aunque una extremadamente baja incidencia de formación pronuclear era frecuentemente observada en los primeros estudios sobre FIV de ovocitos porcinos madurados in vitro (Nagai y cols., 1984; Mattioli y cols., 1988b), diferentes investigaciones desde distintos laboratorios resolvieron este problema (revisado por Day y Funahashi, 1996). Efectivamente, mediante la adición al medio de MIV de cisteína, fluido folicular, cisteamina y beta-mercaptoetanol este problema es minimizado (revisado por Day, 2000). Además, la reducción del tiempo de exposición de los ovocitos a las hormonas gonadotropas (Funahashi y Day, 1993a), la utilización de una reducida concentración de CINA en el medio (Funahashi y cols., 1994b,e) y la adición de células de la granulosa al medio, también parece aumentar la incidencia de formación del pronúcleo masculino.

Sin embargo, el medio de elección para MIV debería ser un medio que no necesitase el cocultivo de los ovocitos con células somáticas o sus secreciones. Recientemente, con el empleo de medios de maduración químicamente definidos, con baja concentración de cloruro sódico y suplementados con cisteína, factor de crecimiento epidérmico (EGF), cisteamina, beta-mercaptoetanol y PVA, como sustitutivo de los materiales biológicos, se han conseguido elevados porcentajes de formación del PNM, siendo éstos similares a los alcanzados con otros medios de MIV suplementados con fluido folicular porcino (Abeydeera y cols., 1999).

Por otro lado, el problema de la polispermia en los sistemas de MIV/FIV/CIV persiste en la actualidad, siendo dicho problema considerado como el principal obstáculo para obtener un gran número de embriones in vitro con una elevada capacidad de desarrollo. Aunque la incidencia de polispermia se ha disminuido en los últimos años, las penetraciones espermáticas múltiples continúan produciéndose en un porcentaje excesivamente elevado, pudiendo ser ésta la causa de la elevada mortalidad embrionaria y/o fetal tras la transferencia de embriones producidos in vitro, ya que los ovocitos penetrados por más de un espermatozoide pueden desarrollarse hasta el estadio de blastocisto con la misma frecuencia que los penetrados normalmente (Han y cols., 1999).

Aunque la mayoría de las primeras investigaciones se realizaron utilizando semen fresco, el empleo de semen criopreservado es preferido al poder utilizar de forma continua espermatozoides procedentes de un mismo eyaculado durante el tiempo de duración de un experimento (Wang y cols., 1991). Sin embargo, el empleo de semen criopreservado en los sistemas de FIV, junto con la posibilidad de utilizar un medio químicamente semidefinido durante la coincubación de los gametos (Abeydeera y Day, 1997b), todavía no ha conducido al desarrollo de un procedimiento con el cual se consigan aceptables tasas de monospermia.

En la especie porcina, la incidencia de penetraciones polispérmicas en condiciones in vivo es inferior al 5%. Básicamente son dos los mecanismos que actúan impidiendo la entrada de más de un espermatozoide en el interior del ovocito: la reducción del número de espermatozoides durante su transporte a través de las distintas regiones del tracto femenino y el bloqueo de zona que experimentan los ovocitos durante la activación. Además, la fecundación oviductal se produce bajo un ambiente específico dominado por la presencia de células, secreciones oviductales y secreciones ováricas liberadas durante la ovulación.

In vitro, se ha intentado imitar las condiciones fisiológicas durante el cocultivo de los gametos. Así, se ha demostrado que un corto periodo de co-preincubación de los espermatozoides con células epiteliales de oviductos porcinos (Nagai y Moor, 1990) o la preincubación espermática en presencia de una baja concentración de fluido folicular

porcino (Funahashi y Day, 1993c) reducen la incidencia de polispermia. Resultados similares se han obtenido al cocultivar ovocitos y espermatozoides en presencia de fluido folicular obtenido durante el estro (Kim y cols., 1996) o en un medio condicionado con secreciones procedentes de las células epiteliales del oviducto (Kano y cols., 1994). Sin embargo, al igual que ocurre con los medios de MIV, sería preferible utilizar medios de cocultivo químicamente definidos, como el desarrollado por Abeydeera y Day (1997b) para estandarizar al máximo posible las condiciones de FIV.

Por otro lado, el estudio comparado de la liberación de los gránulos corticales después de la FIV de ovocitos oviductales madurados *in vivo* y de ovocitos madurados *in vitro* no ha revelado diferencias significativas ni en el grado ni en el momento en que se produce la exocitosis de los gránulos corticales tras la FIV (Wang y cols., 1997b, 1998a,b), lo cual podría haber sido una de las causas de la elevada incidencia de polispermia.

Sin embargo, poco se ha investigado sobre la influencia de diferentes condiciones de cocultivo, tales como el número de espermatozoides, el volumen de medio o el número de ovocitos durante el cocultivo, la utilización de ovocitos rodeados por las células del cúmulus tras su MIV y la duración del periodo de cocultivo, sobre la incidencia de penetraciones polispérmicas y el desarrollo embrionario posterior.

In vivo, si se deposita un elevado número de espermatozoides directamente en el istmo tubárico, el porcentaje de polispermia se incrementa significativamente comparado con la inseminación en el lumen (Hunter, 1973). De la misma manera, *in vitro*, la reducción de la concentración de espermatozoides podría aumentar el porcentaje de ovocitos monospérmicos, teniendo en cuenta que el número final de espermatozoides por ovocito se encuentra directamente influenciado por el volumen de medio utilizado y por el número de ovocitos presente durante el cocultivo. Aunque en la bibliografía aparecen reflejados diferentes volúmenes de medio de cocultivo, número de ovocitos y concentración de espermatozoides durante el cocultivo, son escasos los trabajos que estudian estos parámetros como fuentes de variación.

Por otro lado, durante la fecundación in vivo, los ovocitos se encuentran inmersos en una matriz de mucus y de células del cúmulus cuando son penetrados por los espermatozoides. Sin embargo, in vitro, la tendencia más generalizada es la de utilizar ovocitos desnudos durante el cocultivo, aunque el efecto de la presencia de los complejos cúmulus ovocito (COC) durante la FIV sobre la penetrabilidad de los ovocitos ha dado resultados contradictorios entre los diferentes autores (Coy y cols., 1993a; Wang y cols., 1994; Ka y cols., 1997).

La disminución del tiempo de contacto efectivo entre espermatozoides y ovocitos es otro de los factores que podría influir notablemente sobre el rendimiento final de la FIV. De hecho, la mayoría de los sistemas actuales de FIV utilizan un tiempo máximo de contacto entre espermatozoides y ovocitos de 5-6 horas, periodo muy inferior al utilizado en un principio (12-18 horas). Sin embargo, nuevamente son escasos los trabajos donde se intenta modificar el tiempo de exposición de los ovocitos a las muestras seminales, bien acortando dicho periodo por debajo de las 5 horas o bien utilizando algún tipo de estrategia para que ambos gametos puedan interactuar durante el tiempo preciso para obtener unos elevados índices de penetración y monospermia.

Por todo ello, los objetivos del presente trabajo experimental han sido:

- 1) Determinar el efecto de diferentes volúmenes de medio de cocultivo y de diferente número de ovocitos durante el cocultivo sobre los parámetros de fecundación y sobre el desarrollo embrionario posterior hasta el estadio de blastocisto.
- 2) Estudiar la penetrabilidad y la capacidad de desarrollo embrionario utilizando ovocitos rodeados por las células del cúmulus y diferentes ratios espermatozoides:ovocito durante la FIV.
- 3) Comprobar si la disminución del tiempo de exposición de los ovocitos a los espermatozoides ejerce un efecto positivo sobre el rendimiento de la producción in vitro de embriones.

*Revisión
Bibliográfica*

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fecundación in vitro. Antecedentes

La fecundación in vitro se ha desarrollado con éxito en al menos 20 especies de mamíferos. Los avances en los sistemas de FIV se vieron favorecidos por diferentes investigaciones sobre las distintas partes que componen todo sistema de FIV: espermatozoides, ovocitos, medios de cultivo y condiciones de cultivo. Como consecuencia de estas investigaciones, tras la transferencia de los cigotos resultantes de la fecundación in vitro, se empezó a conseguir descendencia viva en diferentes especies (Tabla 1).

Tabla 1. Nacimiento de descendencia viva tras la transferencia de embriones producidos in vitro.

Conejos	Chang (1959)
Rata	Toyoda y Chang (1974)
Ratón	Pavlok (1967); Hope y Pitts (1973)
Humana	Steptoe y Edwards (1978)
Vaca	Brackett y cols. (1982, 1984)
Cerda	Cheng y cols. (1986)
Oveja	Cheng y cols. (1986)
Gata	Pope y cols. (1989)
Cabra	Jufen y cols. (1991)

La especie porcina fue una de las que más dificultades presentó, debido a la dificultad de encontrar un método satisfactorio de capacitación espermática in vitro. Por este motivo, los primeros intentos de fecundar ovocitos porcinos in vitro fracasaron o fueron esporádicos y de rendimientos muy bajos (Harms y Smidt, 1970; Baker y Polge, 1976; Iritani y cols., 1978). En 1981, Pavlok (1981) demostró que los ovocitos

porcinos libres de zona pelúcida eran penetrados por espermatozoides eyaculados cuando éstos eran preincubados in vitro a elevadas concentraciones. Nagai y cols., (1984) también obtuvieron elevados porcentajes de penetración de ovocitos con la zona intacta inseminados con espermatozoides epididimales preincubados a altas concentraciones. La primera fecundación in vitro con éxito de ovocitos porcinos madurados in vivo fue conseguida por Cheng y cols. en 1985. Estos investigadores utilizaron el protocolo y el medio para la fecundación in vitro porcina propuesto por Pavlok en 1981 con algunas modificaciones. El semen era conservado a 20°C durante 16 horas, lavado y preincubado en TCM-199 (37°C, 4-5 horas a una concentración de 2×10^8 espz/ml) antes de la inseminación de los ovocitos. Este método de capacitación in vitro de los espermatozoides ha sido el método básico de capacitación utilizado por la mayoría de investigadores durante muchos años.

La obtención de los primeros lechones nacidos tras la fecundación in vitro de ovocitos madurados in vivo aumentó el interés sobre la utilización de ovocitos inmaduros foliculares y su maduración in vitro en los sistemas de FIV. En 1988, Mattioli y cols. (Mattioli y cols., 1988a,b) utilizaron un nuevo método para cultivo in vitro de ovocitos que resultó en una adecuada maduración de los mismos, lo cual fue confirmado un año más tarde con el nacimiento de lechones vivos después de la transferencia embrionaria a receptoras (Mattioli y cols., 1989). Las sucesivas investigaciones demostraron que a pesar de que los ovocitos podían ser penetrados en porcentajes muy elevados por los espermatozoides, la proporción de los primeros que proseguían el desarrollo embrionario hasta sufrir la primera segmentación era extremadamente baja. Ésto estaba motivado por una elevada incidencia de polispermia, una reducida proporción de formación del pronúcleo masculino y una baja tasa de desarrollo embrionario temprano. En los últimos diez años se han realizado progresos continuos sobre los sistemas de MIV, FIV y CIV, aunque todavía son pocos los laboratorios que han conseguido descendencia viva tras la transferencia de embriones a hembras receptoras, como se resume en la tabla 2. La alta incidencia de penetraciones polispérmicas todavía existe, aunque este problema ha sido ligeramente aminorado por diferentes modificaciones de las condiciones durante el cocultivo.

Tabla 2: Descendencia viva obtenida tras la transferencia de embriones producidos *in vitro*.

AUTORES	OVOCITOS MADUROS	FUENTE DE ESPERMATOZOIDES	LECHONES VIVOS / GESTANTES
Cheng, Polge y Moor (1986)	In vivo	Fresco	19 / 6
Yoshida (1987)	In vivo	Fresco	4 / 1
Nagai y cols., (1988b)	<i>In vivo</i>	Criopreservado	1 / 1
Mattioli y cols., (1989)	In vitro	Fresco	9 / 1
Yoshida (1989)	In vivo	Fresco	12 / 2
Nagai y cols., (1990)	<i>In vitro</i>	Fresco	1 / 1
Yoshida y cols., (1993b)	<i>In vitro</i>	Fresco	3 / 1
Funahashi y cols., (1996)	<i>In vitro</i>	Fresco	1 / 1
Rath y cols., (1997)	<i>In vivo</i>	Separado X	6 / 1
		Separado Y	4 / 1
Funahashi y cols., (1997b)	<i>In vitro</i>	Fresco	19 / 3
Abeydeera y cols., (1998c)	<i>In vitro</i>	Criopreservado	7 / 1 11 / 2
Abeydeera y cols., (1998a)	<i>In vitro</i>	Criopreservado	18 / 5
Abeydeera y cols., (1998e)	<i>In vitro</i>	Separado X	24 / 5
		Separado Y	9 / 3
Kikuchi y cols., (1999)	<i>In vitro</i>	Criopreservado	17 / 3
Abeydeera y cols., (no publicado)	<i>In vitro</i>	Criopreservado	82 / 12

2.2. Maduración del ovocito

2.2.1. Maduración in vivo

Se entiende por maduración del ovocito todos los cambios nucleares, citoplasmáticos y de membrana, que acontecen en el ovocito entre el pico preovulatorio de LH y la ovulación. Durante este periodo, el ovocito reanuda la meiosis, progresando hasta el estadio de Metafase II (MII), con la extrusión del primer corpúsculo polar (MN:maduración nuclear) y adquirirá las sustancias necesarias para su correcta fecundación y desarrollo embrionario posterior (MC:maduración citoplasmática) (Sorensen y Wassarman, 1976; Motlik y cols., 1984; Moor y cols., 1990; Eppig, 1996). Los ovocitos adquieren la capacidad para reanudar la meiosis una vez finalizada su fase de crecimiento, lo cual sucede cuando el folículo presenta un antro de aproximadamente 2'4 mm de diámetro (Motlik y cols., 1984). Una vez se reanuda la meiosis tras el pico preovulatorio de LH, se inicia una fase de diferenciación intracelular que va a conferir al ovocito su capacidad para formar el pronúcleo masculino (PNM) tras la penetración espermática (Thibault y cols., 1987; Hyttel y cols., 1997), siendo imprescindible para ello una correcta interacción entre el ovocito y las células foliculares. Durante este periodo de MC, gran cantidad del ARNm acumulado durante la fase de crecimiento del ovocito será utilizado en la síntesis de proteínas esenciales, tales como el factor promotor del crecimiento del pronúcleo masculino (MPGF: Thibault y Gerard, 1973) necesario para la descondensación espermática y formación del pronúcleo masculino (Moor y cols., 1990), y en la síntesis de proteínas necesarias durante el proceso de la fecundación y el desarrollo embrionario (Eppig, 1996; Singh y cols., 1997). Además durante este periodo se produce una reestructuración citoplasmática de las mitocondrias, que se reúnen alrededor del núcleo (Thibault y cols., 1987), y de los gránulos corticales que migran hacia la periferia del ooplasma, formando un estrato por debajo de la membrana celular al final de la maduración (Cran y Cheng, 1986), hecho que jugará un papel fundamental en la instauración del bloqueo a la polispermia.

De forma general, se puede decir que la maduración total del ovocito se relaciona con una complicada combinación de factores secretados por las células foliculares y la acción de las gonadotropinas (Liu y cols., 1997), caracterizándose desde el punto de vista morfológico por la presencia del primer corpúsculo polar y la expansión y mucificación de las células del cúmulus que rodean al ovocito (Eppig, 1979). Los factores implicados tanto en la maduración nuclear como en la citoplasmática han sido extensamente revisados por (Martínez, 1992; Martínez y cols., 1996; Niwa, 1993; Lucas, 1998).

2.2.2. Maduración in vitro

La utilización de ovocitos madurados in vitro a partir de ovocitos inmaduros procedentes de ovarios de cerdas prepuberales sacrificadas en matadero presenta la ventaja de poder disponer de una fuente prácticamente ilimitada, y a muy bajo costo, de gametos femeninos. La técnica de maduración in vitro propiamente dicha consiste en el mantenimiento de los ovocitos en un medio de cultivo adecuado durante un periodo de tiempo semejante al que transcurre in vivo desde el pico preovulatorio de LH hasta la ovulación. El éxito de la misma depende de que las condiciones que soporten los ovocitos durante este tiempo se asemejen en lo posible a las que se producen durante la maduración fisiológica en el animal. In vivo, el ovocito está expuesto a concentraciones variables de gonadotropinas, esteroides (progesterona y estradiol), factores de crecimiento y otras moléculas desconocidas que pueden interactuar entre sí regulando los cambios maduracionales que afectan al ovocito y a las células del cúmulus durante el periodo preovulatorio (Singh y cols., 1993).

In vivo, se ha determinado el tiempo necesario para completar la MN mediante la administración de gonadotropina coriónica humana (hCG) induciendo así la reanudación de la meiosis (Hunter y Polge, 1966). El intervalo requerido para la desaparición de la vesícula germinal (VG) y alcanzar el estadio de MII después de la administración de hCG es de 36-40 horas. Por este motivo, el tiempo de cultivo de los ovocitos para su maduración in vitro suele variar entre 36 y 48 horas, siendo 40-44 horas la duración del cultivo más corrientemente utilizada (Prather y Day, 1998). Hay que tener en cuenta que un tiempo de cultivo demasiado prolongado provoca el envejecimiento de los ovocitos y disminuye su capacidad de formación del pronúcleo masculino (Ocampo y cols., 1993).

In vivo, los ovocitos envejecidos (6-8 horas postovulación) tienen una mayor probabilidad de ser penetrados polispermicamente y de fragmentarse (Hunter, 1967).

Con los diferentes medios y condiciones de cultivo utilizados se consiguen altos porcentajes de MN, determinada ésta por la visualización del primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino y progresión meiótica a Met II (Prather y Day, 1998).

La MC, determinada por la incidencia en la formación de PNM, fue durante mucho tiempo uno de los principales problemas en los sistemas de FIV. En los primeros estudios, sólo una pequeña proporción de los espermatozoides que penetraban en el interior de los ovocitos madurados in vitro eran capaces de transformarse en pronúcleos masculinos (Mattioli y cols., 1988a; Wang y cols., 1991; Laurincik y cols., 1994). Esta alteración se atribuyó a una incorrecta MC, como consecuencia de la utilización de condiciones inadecuadas durante la maduración. Diversos estudios mostraron que la capacidad de los ovocitos porcinos para formar el PNM era afectada por niveles hormonales, secreciones foliculares, iones intracelulares y, especialmente, por el estrés oxidativo (revisado por Day y Funahashi en 1996). Estudios posteriores (Funahashi y cols., 1994b; Yoshida y cols., 1993a; Yoshida y cols., 1993b) indicaron que la capacidad para la formación del PNM estaba altamente correlacionada con el contenido de glutatión (GSH) existente en el interior del ovocito. El glutatión es el tiol libre intracelular más importante que regula la proliferación celular, el transporte de aminoácidos, la síntesis de proteínas y ADN y la reducción de puentes disulfuros y de otras sustancias químicas (Kosowa y Kosowa, 1978; Meister y Anderson, 1983), estando implicado en la reducción de los puentes disulfuro de las protaminas del espermatozoide lo que inicia la descondensación espermática (Perreault, 1990). En la actualidad, los porcentajes obtenidos de MC tras la MIV de los ovocitos se encuentran alrededor del 85-95% (Funahashi y Day, 1996).

2.2.2.1. Factores que influyen en la MIV

2.2.2.1.1. Procedencia de los ovocitos

Ya que la fase de crecimiento del ovocito finaliza cuando éste se encuentra en folículos antrales de más de 2 mm de diámetro (Motlik y cols., 1984), y que el ovocito adquiere su capacidad meiótica una vez finalizada dicha fase, los complejos cúmulus-ovocito (COC) obtenidos a partir de folículos antrales de más de 3 mm de diámetro representan la principal fuente de ovocitos para la producción de embriones porcinos *in vitro* (revisado por Day y Funahashi, 1996).

Sin embargo, existe una gran variabilidad, tanto en el tamaño como en el estadio de VG, entre ovocitos procedentes de diferentes diámetros foliculares e incluso entre los procedentes de un mismo tamaño folicular (Lucas y cols., 2001). Esta variabilidad en la morfología de la VG puede ser una de las principales causas de variación en los resultados obtenidos tras la MIV, FIV y CIV de los ovocitos. El uso de COC de alta calidad y sincronizados meióticamente, al inicio del cultivo de maduración, podría mejorar los resultados de MIV y FIV y consecuentemente los de desarrollo embrionario. Así, se ha comprobado que la exposición de los ovocitos al dbcAMP durante las primeras 20 horas de MIV (Funahashi y cols., 1997b) o la preincubación de los ovocitos durante 12 horas en medio de maduración sin gonadotropinas (Funahashi y cols., 1997a), aumenta la homogeneidad de la maduración nuclear y mejora la capacidad de desarrollo hasta el estadio de blastocisto de los ovocitos madurados *in vitro*.

Otros factores que pueden afectar a la calidad de los ovocitos son el método de colección de COC (disección o aspiración: Nagai, 1994), la presencia de cuerpos lúteos en los ovarios (Ocampo y cols. 1993) y la edad y atresia folicular (Ding y Foxcroft, 1992; Lucas, 1998).

2.2.2.1.2. Efecto de las células foliculares

En 1988, Mattioli y cols. observaron que cultivando *in vitro* los COC conectados a la pared extrovertida de los folículos se incrementaba la formación de PNM en los ovocitos penetrados, pudiendo éstos desarrollarse hasta el estadio de blastocisto, dando como resultado, tras transferencia embrionaria, el nacimiento de lechones vivos (Mattioli y cols., 1989). La secreción de las células somáticas foliculares influye sobre la maduración completa del ovocito y estabiliza la distribución de los gránulos corticales (Galeati y cols., 1991), además de favorecer la formación del PNM (Nagai y cols., 1993; Ding y Foxcroft, 1994a). Efectivamente, la presencia de células del cúmulus rodeando a los ovocitos es necesaria para la correcta maduración de éstos, ya que debe existir una comunicación directa, vía gap junctions, entre las células somáticas y el ovocito para la transmisión de factores reguladores de la meiosis como el AMPc (Mattioli y cols., 1994; Aktas y cols., 1995; Petr y cols., 1996) y el OMI o factor inhibidor de la meiosis (Tsafiriri y Channing, 1975; Stone y cols., 1978). Además, esta intercomunicación provee al ovocito de los nutrientes necesarios para su desarrollo (Moor y cols., 1980; Buccione y cols., 1990) y de los aminoácidos del medio de maduración necesarios para la síntesis de proteínas (Ka y cols., 1997), tales como el MPGF fundamental para la formación del pronúcleo masculino.

Por otro lado, Abeydeera y cols., (1998a) observaron que la adición de células de la granulosa y de la teca (FSP: follicular shell pieces) durante la MIV de COC, aunque no afectaba a los parámetros de fecundación o división, incrementaba la concentración intracelular de GSH, al impedir, posiblemente, la oxidación de la cisteína disponible en el medio de maduración, mejorando el desarrollo de los embriones hasta el estadio de blastocisto (18% vs. 36%). Ésto indica que las células foliculares de la pared folicular mejoran la maduración citoplasmática necesaria para el posterior desarrollo embrionario.

2.2.2.1.3. Efecto de la suplementación del medio de maduración

Son varios los medios que han sido utilizados por los distintos autores para la maduración *in vitro* de los ovocitos porcinos. Los más conocidos son el medio modificado Krebs-Ringer Bicarbonato (Naito y cols., 1988), el medio modificado TCM-199 con sales de Earle (Mattioli y cols., 1989; Yoshida y cols., 1989, 1990; Wang y cols., 1991; Funahashi y cols., 1994a,b), el medio modificado Tirode-Lactato-Piruvato-

Polivinilalcohol (mTLP-PVA) (Bavister, 1989), el medio Waymouth MB (Yoshida y cols., 1992b), el medio modificado Whitthen's medium (mWM) (Funahashi y cols., 1994c) y el medio North Caroline State University sin albúmina sérica bovina (NCSU-23) (Abeydeera y Day, 1997b), el cual fue desarrollado para el cultivo de embriones en ratón (Whitten y Biggers, 1968) y cerdo (Petters y Wells, 1993).

El uso de un medio de maduración con baja concentración de ClNa o con la presencia de osmolitos orgánicos (como taurina y sorbitol) parece ser necesario para la maduración citoplasmática y por tanto para el posterior desarrollo embrionario (Funahashi y cols., 1996). Una elevada concentración de ClNa en el medio de maduración tiene un efecto negativo en la MC reflejado no sólo por la actividad de la histona H1 kinasa (Funahashi y cols., 1994e), por la organización de microfilamentos (Funahashi y cols. 1995) y el contenido de GSH al final de la MIV, sino también por la incidencia de formación del PNM (Funahashi y cols., 1994b) y posterior desarrollo embrionario. Asimismo, la incorporación al medio de maduración de cisteína aumenta el GSH en ovocitos porcinos (Yoshida y cols., 1993a,b; Sawai y cols., 1997) y mejora no sólo la formación del PNM tras la penetración espermática, también mejora el desarrollo embrionario. Por lo tanto éstas son condiciones que cumplen todos los medios de maduración utilizados.

En la actualidad con los medios usados para MIV se obtienen altos porcentajes de MN y MC, dependiendo de la suplementación utilizada: hormonas, suero y/o fluido folicular y factores de crecimiento.

El efecto beneficioso de la suplementación del medio de maduración con hormonas ha sido ampliamente estudiado y publicado por muchos laboratorios (Meinecke-Meinecke Tillman, 1979; Mattioli y cols., 1986; Racowsky y McGaughey, 1982; Fukui y Ono, 1989; Funahashi y cols., 1994a). Se ha comprobado los efectos positivos de la suplementación del medio de maduración durante al menos las primeras 24 horas de incubación con gonadotropinas no sólo sobre la MN y la expansión de las células del cúmulus (Yoshida y cols., 1989; Mattioli y cols., 1991), sino también sobre la maduración citoplasmática de los ovocitos porcinos (Funahashi y Day, 1993a; Funahashi y cols., 1994a; Liu y cols., 1997). En la actualidad, en todos los laboratorios dedicados a

la producción in vitro de embriones porcinos es norma fundamental suplementar el medio de maduración con gonadotropinas.

En general, la mayoría de los medios de maduración han sido suplementados con suero fetal bovino (FCS) (Mattioli y cols., 1988b; Ding y Foxcroft, 1992; Nagai y cols., 1993; Zheng y Sirard, 1992; Yoshida y cols., 1990; Galeati y cols., 1991; Wang y cols., 1991) y/o fluido folicular porcino (FFp) (Naito y cols., 1988; Daen y cols., 1994; Funahashi y cols., 1994a; Yoshida y cols., 1992a; Abeydeera y Day, 1997a,b). Sin embargo, se ha demostrado que el FCS perjudica la MC cuando se utiliza medio KRBm (Naito y cols., 1988) o TCM-199m (Funahashi y Day, 1993b) como medios de maduración in vitro. Por otro lado, el efecto beneficioso del FFp sobre la maduración in vitro de los ovocitos es incuestionable. No obstante, en el FFp, al igual que sucede en el FCS, son abundantes los factores de crecimiento y hormonas, además de otros muchos factores desconocidos (FCS: Hsu y cols., 1987; Younis y cols., 1989. FFp: Hsu y cols., 1987; Aisnsworth y cols., 1980; Ding y Foxcroft, 1992). Por tanto, la suplementación del medio de maduración in vitro con FFp impide un apropiado control de calidad y aumenta la variabilidad de los resultados intra y entre laboratorios. Para eliminar tal variabilidad es necesario utilizar un medio de MIV definido, lo cual, además, ayudaría al entendimiento de los mecanismos moleculares básicos responsables de la estimulación o inhibición de la MN y MC de los ovocitos. En bovino, los ovocitos madurados in vitro en un medio libre de proteína (PF:protein free) son fecundados y se desarrollan hasta el estadio de blastocisto en cultivo in vitro (Saeki y cols., 1991; Keskinetepe y Brackett, 1996). Igualmente los ovocitos porcinos pueden ser madurados en medio libre de proteína y fecundados in vitro (Coskum y Lin, 1995; Wang y Niwa, 1995a,b). Abeydeera y cols., (1998d) estudiaron tres medios libres de proteína (PF-NCSU23, PF-TCM-199 y PF-WM) comparándolos con el medio con proteína (NCSU23-FFp), demostrando que los ovocitos porcinos pueden ser madurados en el medio PF-TCM-199, fecundados y desarrollados hasta el estadio de blastocisto al igual que en un medio con proteína. La tendencia actual es la de utilizar medios químicamente definidos sin aporte alguno de una fuente proteica de composición desconocida.

Las secreciones foliculares contienen factores estimulantes que promueven la maduración de los ovocitos (Mattioli y cols., 1988a,b; Naito y cols., 1988; Yoshida y

cols., 1992a; Funahashi y Day, 1993b), tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento insulínico (IGF-I). Estos factores se encuentran presentes en el fluido folicular y son expresados por las células de la granulosa (Hammond y cols., 1993). El efecto positivo del EGF exógeno sobre la MIV ha sido demostrado en ratón (Downs y cols., 1988), bovino (Lorenzo y cols., 1994), humanos (Das y cols., 1991) y porcino (Coskun y Lin, 1993). Este factor de crecimiento ha sido encontrado en elevadas concentraciones en el FFp (Hsu y cols., 1987) y su efecto sobre la MN y en la MC de los ovocitos porcinos ha sido estudiado por varios investigadores (Reed y cols., 1993; Ding y Foxcroft, 1994b; Wang y Niwa, 1995b). En ese sentido, Reed y cols. (1993) encontraron que el EGF junto con la FSH, la LH y la prolactina, podrían promover la MN de los ovocitos porcinos de forma similar al FFp. Por otro lado, Singh y cols. (1993) demostraron que el EGF era un potente inductor de la maduración meiótica y de la expansión de las células del cúmulus y que su efecto era aumentado por la FSH. Sin embargo, Abeydeera y cols. (1998c) encontraron que la presencia de EGF en el medio de maduración in vitro no afectaba a la expansión de las células del cúmulus, ni a la maduración ni a los porcentajes de fecundación o división, aunque sí se incrementaba el porcentaje de blastocistos obtenidos, dependiendo de la concentración de EGF utilizada (42% de blastocistos con 10 ng/ml del EGF en el medio de MIV frente a un 21% de blastocistos sin adición del EGF). De forma similar, la adición de IGF-I al medio de MIV no parece afectar a la MN de ovocitos porcinos (Reed y cols., 1993; Grupen y cols., 1997) pero sí estimula la incidencia de divisiones embrionarias y la formación de blastocistos (Xia y cols., 1994).

2.3. Penetración espermática

Se han realizado numerosas investigaciones relacionadas con el cocultivo de los gametos para intentar disminuir al máximo las penetraciones polispérmicas. Sin embargo, el porcentaje de ovocitos monospérmicos obtenido tras la FIV todavía no es suficiente

para obtener un elevado número de embriones viables con posibilidad de desarrollarse hasta el estadio de blastocisto.

2.3.1. Prevención de la polispermia in vivo

El 95% de los ovocitos madurados y fecundados in vivo son monospermicos (Hunter, 1967, 1972). Los principales mecanismos para prevenir in vivo la fecundación polispermica de los ovocitos porcinos son el tracto reproductivo femenino y la respuesta del propio ovocito durante la penetración espermática.

2.3.1.1. *El tracto reproductivo femenino*

El ovario, la unión útero tubárica (UUT) y el istmo controlan, reducen y seleccionan la población de espermatozoides capacitados que llega al lugar de la fecundación (Hunter, 1991, 1996), de forma que sólo consiguen alcanzar el lugar de la fecundación un número menor de 100 espermatozoides por ovocito (Hunter, 1982; Mburu y cols., 1996). Efectivamente, durante la inseminación artificial o la cubrición natural, miles de millones de espermatozoides se depositan en el útero. Sin embargo, tan sólo 100.000 ó 200.000 espermatozoides colonizan la UUT (1-2 horas postdeposición), unos cuantos miles alcanzan el reservorio espermático y, únicamente, varios centenares llegan al lugar de la fecundación, donde se encuentran los ovocitos rodeados por las células foliculares totalmente expandidas y mucificadas en un volumen de fluido escaso. En estas condiciones el porcentaje de ovocitos fecundados por más de un espermatozoide es inferior al 5% (Hunter, 1967, 1972).

El oviducto ha sido considerado durante muchos años como un simple nexo de unión entre el útero y el ovario. Sin embargo, en la actualidad, cada día se da mayor importancia a las funciones que implícitamente desarrolla este conducto al ser el lugar donde ocurren los distintos acontecimientos que desembocan en la unión del gameto masculino y femenino y en el desarrollo embrionario temprano (revisado por Rodríguez-Martínez, 1998). Uno de esos acontecimientos consiste en el transporte, almacenamiento y capacitación espermática.

El propósito primario del transporte espermático es el establecimiento de una población de espermatozoides competentes en el lugar de la fecundación o cerca de él en el momento de la ovulación, de tal forma que los fenómenos de penetración y activación puedan ocurrir antes de que comience el envejecimiento del ovocito (Hunter, 1980). El transporte de los espermatozoides porcinos en el tracto genital de la hembra se divide tradicionalmente en tres fases: un transporte rápido a través de los cuernos uterinos, la invasión de los espermatozoides del reservorio espermático en la UUT y su liberación paulatina hacia el lugar de la fecundación, relacionada con la ovulación. La extremidad caudal del oviducto, la UUT, es bañada por los espermatozoides al final de la cubrición. Bajo estas condiciones, los espermatozoides podrían entrar en el oviducto poco después de la cubrición y de hecho, algunos espermatozoides viables se encuentran en el istmo entre 15 minutos y 1 hora después de la cubrición (Hunter y Hall, 1974; Hunter, 1981). Sin embargo, la población fecundante de espermatozoides se almacena en el lado oviductal de la UUT, en los 2 primeros centímetros del istmo, hasta que la ovulación es inminente. Ésta, por tanto, es la región considerada como el reservorio principal de espermatozoides (Hunter, 1981). El almacenamiento de espermatozoides en la región caudal del istmo oviductal se puede prolongar durante 36 horas o incluso más (Hunter, 1981,1984; Pollard y cols., 1991; Raycoudhurry y Suárez, 1991), debido a que la motilidad de los espermatozoides en el reservorio cesa y a que la superficie de los espermatozoides permanece intacta (Overstreet y cols., 1980; Hunter, 1984; Suárez y cols., 1991). Al menos son tres las funciones que se han atribuido al reservorio espermático (Rodríguez-Martínez, 1998): la prevención de la polispermia, por el acusado descenso de espermatozoides a lo largo del tubo; el mantenimiento de la viabilidad espermática y de la capacidad fecundante y la modulación del proceso de la capacitación. Momentos antes de la ovulación (1-2 horas), comienza la liberación progresiva, en número muy controlado, de los espermatozoides y su desplazamiento desde el reservorio hacia la región ampular-ístmica (Hunter y cols., 1983). Esto implica una reducción del número de espermatozoides, por lo que se previene la polispermia (Mburu y cols., 1997). Este fenómeno de liberación espermática controlada se encuentra bajo control endocrino del ovario (Hunter, 1988).

2.3.1.2. La respuesta directa de los ovocitos

La reacción de zona, con la exocitosis del contenido de los gránulos corticales (Wassarman, 1988; Cran y Esper, 1990; Jones, 1990), es el principal mecanismo que dispone el ovocito porcino para evitar la entrada en su citoplasma de más de un espermatozoide. Al final de la maduración de los ovocitos, se produce una migración de los gránulos corticales hacia la membrana plasmática (Ducibella y cols., 1988; Wang y cols., 1997a,b,c). Durante la fecundación, la penetración del espermatozoide induce la exocitosis de los gránulos corticales, que contienen enzimas hidrolíticos y componentes sacáridos, cuyo contenido se dispersa en el espacio perivitelino y produce la formación de una especie de cubierta cortical granular (Dandekar y Talbot, 1992; Dandekar y cols., 1995), modificaciones en las proteínas de la zona pelúcida y la inactivación de los receptores espermáticos, bloqueando así la penetración de más de un espermatozoide (Schmell y cols., 1983; Hoodbhoy y Talbot, 1994; Yanagimachi, 1994). Sin embargo, la reacción de zona no es suficiente cuando los ovocitos se exponen a un número de espermatozoides superior al fisiológico. Efectivamente, se ha observado que ovocitos madurados in vivo y fecundados in vitro pueden alcanzar niveles de hasta un 100% de polispermia (Prather y Day, 1998).

2.3.2. Prevención de la polispermia in vitro

El ambiente en el que se encuentran los ovocitos durante la fecundación in vitro es muy diferente del existente en el oviducto. In vivo, tanto las células del cúmulus y la matrix intercelular que se encuentran presentes al principio de la estancia del ovocito en el oviducto como el volumen de fluido oviductal y el número de espermatozoides son muy diferentes a las condiciones in vitro. Además, el tipo de espermatozoide utilizado, el medio de cocultivo y la adición de diferentes componentes durante el cocultivo pueden influir marcadamente sobre los niveles de polispermia y por tanto de desarrollo embrionario.

2.3.2.1. Respuesta de los ovocitos in vitro

Se ha sugerido que el retraso en la exocitosis de los gránulos corticales puede ser una de las principales causas de polispermia bajo condiciones in vitro (Sathanathan y Trounson, 1982; Cran y Cheng, 1986; Kim y cols., 1996; Wang y cols., 1997a). Sin

embargo, bajo las condiciones de cultivo de Abeydeera y Day (1998a), la migración de los gránulos corticales hacia la membrana plasmática durante la maduración es similar en ovocitos madurados in vivo e in vitro. Induciendo la exocitosis de los gránulos corticales con calcio ionóforo, Wang y cols. (1998a) encontraron que el 60-70% de la exocitosis de los gránulos corticales era suficiente para inducir la reacción de zona. Se ha demostrado que a las 6 horas de la fecundación in vitro se ha producido la liberación del 80% de los gránulos corticales, tanto en ovocitos monospermicos como en los polispermicos (Wang y cols., 1997b). Aunque la exocitosis de los gránulos corticales de los ovocitos madurados in vitro ocurre poco después de la activación del ovocito, la reacción de zona no se produce hasta 30-40 minutos después de la exocitosis de dichos gránulos (Wang y cols., 1999b). Ya que in vitro existe una elevada concentración de espermatozoides durante el cocultivo, los espermatozoides pueden seguir penetrando en el interior del ovocito antes de que este establezca una completa reacción zona. Por lo tanto, la razón de la penetración espermática simultánea puede ser debida a la elevada concentración de espermatozoides utilizada en la fecundación in vitro, lo cual también se observa in vivo cuando un número elevado de espermatozoides es depositado en el oviducto (Hunter, 1991). No obstante, se ha conseguido disminuir la fecundación polispermica incubando ovocitos madurados in vitro con células oviductales (Kano y cols., 1994) o con fluido oviductal (Kim y cols., 1996) antes de la fecundación in vitro. Esto sugiere que algún componente del ovocito se modifica en presencia de las secreciones oviductales y puede aumentar la reacción de las enzimas.

2.3.2.2. Efecto de diferentes condiciones de cocultivo sobre la polispermia

2.3.2.2.1. Fuente y preparación de espermatozoides

Hasta hace poco tiempo, los espermatozoides obtenidos a partir de la fracción rica de los eyaculados, frescos o refrigerados durante 24-48 horas, constituían la principal fuente de espermatozoides en la mayoría de los sistemas de fecundación in vitro de ovocitos porcinos madurados in vivo (Yoshida, 1987, 1989) o in vitro (Yoshida y cols., 1990; Zheng y Sirad, 1992; Funahashi y Day, 1993b; Rath y cols., 1995; Mattioli y cols.,

1988b; Naito y cols., 1988). Sin embargo, el uso de semen fresco lleva consigo una gran variación de resultados, en términos de penetración espermática y/o polispermia, entre laboratorios e incluso dentro de un mismo laboratorio, debido a las diferencias en la capacidad fecundante de los espermatozoides de diferentes verracos (Martínez y cols., 1993, 1998; Matas y cols., 1996) e incluso entre los eyaculados de un mismo verraco (Berger y Horton, 1988). El uso repetido de muestras espermáticas con las mismas características supone una gran ventaja en los sistemas de fecundación in vitro, pudiéndose ésto conseguir mediante la utilización de semen criopreservado. La utilización de semen criopreservado posibilita el estudio de otros factores que pueden influir en los resultados de polispermia y de desarrollo embrionario.

Los primeros intentos de fecundación in vitro con espermatozoides congelados-descongelados, utilizando el mismo método de capacitación que Cheng en 1986, mostraron una reducción de la motilidad espermática (Clarke y Johnson, 1987; Nagai y cols., 1988b) y una pérdida total de la capacidad fecundante de los espermatozoides tanto cuando se utilizaban ovocitos madurados in vivo como in vitro (Nagai y cols., 1988b). Los resultados de Wang y cols., (1991) indicaron que los espermatozoides congelados-descongelados podían penetrar ovocitos madurados in vitro, cuando éstos no se preincubaban tras la descongelación. Efectivamente, Zheng y cols. (1992), para evitar la rápida pérdida de la motilidad de los espermatozoides tras su descongelación, utilizaron una población de espermatozoides móviles seleccionada inmediatamente después del lavado por centrifugación y obtuvieron porcentajes de penetración con semen congelado-descongelado similares a los del semen fresco, siendo el porcentaje de polispermia menor y el de formación de PNM mayor que aquellos ovocitos penetrados por espermatozoides frescos. En 1997, Abeydeera y Day (1997b) se obtiene por primera vez embriones en estadio de blastocisto tras la FIV de ovocitos madurados in vitro con espermatozoides criopreservados, siendo el porcentaje de blastocistos superior al obtenido hasta ese momento con semen fresco.

2.3.2.2.2. Efecto de las células del cúmulus durante el cocultivo

Se sabe que las células del cúmulus producen un efecto positivo sobre la capacitación y reacción acrosómica de los espermatozoides (Gwatkin y cols., 1972;

Yanagimachi, 1988) y en el medio de cocultivo podrían ejercer su efecto reduciendo los choques espermatozoides-ovocito (Barros y Yanagimachi, 1972) y mejorando la viabilidad de los ovocitos en el cultivo (Yang y Yanagimachi, 1989; Sato y cols., 1990). Sin embargo, el efecto de la presencia de las células del cúmulus sobre los resultados de la FIV varía entre las especies. Por ejemplo, en el conejo y en el hámster, la eliminación de las células del cúmulus antes de la FIV no afecta el porcentaje de ovocitos penetrados *in vitro* (Chang y cols., 1971; Fraser y cols., 1971; Miyamoto y Chang, 1972), mientras que en el ratón dicho porcentaje disminuye (Cross y Brinster, 1970; Miyamoto y Chang, 1972). En porcino, el efecto de las células del cúmulus ha sido objeto de diferentes estudios, con resultados contradictorios (Tablas 3 y 4), aunque parece que cuando se eliminan las células del cúmulus antes de la FIV se obtienen menores porcentajes de penetración y una mayor proporción de ovocitos monospermicos.

Tabla 3: Efecto de la presencia (+) o ausencia (-) de las células del cúmulus durante la FIV sobre los parámetros de fecundación.

	Maduración	Células del cúmulus	Parámetros de fecundación		
			Penetrados (%)	Polispermicos (%)	Espermatozoides/ovocito
Coy y cols., (1993a)	<i>In Vivo</i>	+	69'1	39'02	1'52
		-	53'7	60'55	2'33
Niwa,	<i>In Vitro</i>	+	82	84	4'5

(1993)		-	56	66	2'5
Wang y cols., (1994)	<i>In Vitro</i>	+	100	100	9'9
		-	84	54	2'2
Ka y cols., (1997)	<i>In Vitro</i>	+	98	96	4
		-	96	69	3'1

2.3.2.2.3. Medios de cocultivo

En general los medios de FIV de ovocitos porcinos han sido TCM-199 (Yoshida y cols., 1990; Funahashi y cols., 1994a; Nagai y Moor, 1990), el medio Brackett y Oliphant (BO) (Wang y cols., 1995c; Kikuchi y cols., 1993) o la solución Krebs-Ringer bicarbonato modificado (Naito y cols., 1988). Sin embargo, estos medios necesitan la adición de FCS para obtener unos resultados aceptables de penetración. Recientemente, se ha desarrollado un medio de FIV químicamente semidefinido, sin bicarbonato, designado como medio Tris-buffered modificado (TBMm: Abeydera y cols., 1997a). Con este medio es posible disminuir la variabilidad de resultados obtenida entre los distintos laboratorios.

Tabla 4: Efecto de la concentración de espermatozoides epididimales criopreservados/descongelados, en la fecundación in vitro de ovocitos con células del cúmulus intactas (+) y de ovocitos desnudos (-) (Nagai y cols., 1998).

Espermatozoides /ml	Células del cúmulus	Parámetros de fecundación		
		Penetrados (%)	Polispérmicos (%)	Espermatozoide s/ ovocito
5 x 10 ⁴	-	28'8	28'57	1'33
	+	26'8	21'05	1'19
1 x 10 ⁵	-	20'8	6'66	1'04

	+	45'6	33'33	1'33
5 x 10 ⁵	-	72'5	36'2	1'67
	+	87'1	83'78	3'47
1 x 10 ⁶	-	95'4	80'64	3'47
	+	98'7	93'59	1'33

Tres son los componentes principales de los medios de FIV en relación a los parámetros de fecundación: el calcio, la BSA y la cafeína.

Es sabido que el calcio extracelular es necesario en la fecundación de mamíferos (Iwamatsy y Chang, 1971), para que se produzca la capacitación y la exocitosis acrosomal de los espermatozoides (Fraser, 1995), además de activar la función de las enzimas de los gránulos corticales (Cran y Cheng, 1986). Según Mori y cols. (1996), la suplementación con 1'125 y 2'5 mM de Cl₂Ca del medio BO durante la FIV de ovocitos porcinos no influye en el porcentaje de penetración, aunque con la concentración de calcio más elevada se incrementa significativamente el porcentaje de ovocitos polispermicos. Asimismo, Abeydeera y Day, (1997a) mostraron un incremento significativo en los porcentajes de penetración, polispermia y en el número de espermatozoides por ovocito penetrado conforme se aumenta la concentración de Cl₂Ca en el medio de FIV (TBMm) de 2'5 mM a 10 mM, observando los mayores porcentajes de penetración con las concentraciones de 7'5 mM (87%) y 10 mM (92%), aunque, desafortunadamente, los porcentajes de ovocitos polispermicos también se incrementaron (62% y 84%, respectivamente).

La concentración de BSA y cafeína en el medio de fecundación también pueden modular los parámetros de fecundación. La suplementación del medio de fecundación con BSA aumenta el número medio de espermatozoides por ovocito penetrado (Abeydeera y Day, 1997a) por lo que puede estimular la capacitación de los espermatozoides. En cuanto a la cafeína, se sabe que aumenta y prolonga la motilidad de espermatozoides de toro y verraco (Garbers y cols., 1971, 1973) y que su presencia en el medio de

fecundación durante la FIV de ovocitos bovinos (Niwa y Ohgoda, 1988) y porcinos (Wang y cols, 1991; Abeydeera y Day, 1997a) con semen descongelado incrementa la polispermia y el número de espermatozoides por ovocito penetrado, dependiendo de la concentración de cafeína utilizada.

2.3.2.2.4. Efecto del volumen de medio, de la concentración de espermatozoides y del número de ovocitos durante el cocultivo

Otro factor que puede influenciar los resultados de la FIV es el volumen del medio de coincubación, al afectar al número de espermatozoides presentes en el cocultivo. De hecho, se ha comprobado que el volumen de cocultivo influye sobre los porcentajes de penetración y monospermia de ovocitos de rata (Niwa y Chang, 1974).

En los sistemas de FIV en la especie porcina, diferentes volúmenes de medio de cocultivo han sido usados entre los distintos laboratorios, 2 ml, 0'4 ml, 0'1 ml e incluso hasta 5ml (Laurincik y cols., 1994), obteniendo resultados variables, como se muestra en las tablas 5 y 6. Sin embargo, poco se ha estudiado sobre su efecto en los parámetros de fecundación. Coy y cols., (1993a) estudiaron la influencia de dos volúmenes de cocultivo (2 y 0'4 ml) en la fecundación in vitro de ovocitos porcinos madurados in vivo, y aunque no obtuvieron diferencias significativas en los parámetros de fecundación, observaron que el volumen de coincubación de gametos parecía afectar a la monospermia obteniendo mejores resultados con el bajo volumen, (37'8% y 43'5% para los volúmenes de 2 y 0'4 ml respectivamente).

Tabla 5: Efecto del volumen de medio, de la concentración de espermatozoides y del número de ovocitos madurados in vivo durante el cocultivo usados por distintos investigadores.

	NOOC	VM (ml)	Fuente esperm	Esperm/ ml	Esperm/ ovo	Parámetros de Fecundación	
						Penetrados (%)	Polispérmicos (%)
<i>Cheng y cols., (1986)</i>	15-20	2	Fresco	10^5-10^6	10.000	89	35-48
<i>Yoshida (1987)</i>	10-15	0'2	Fresco	2×10^6	40.000	95	25-100
<i>Nagai y cols., (1988b)</i>	10-15	0'4	Criopr	24×10^6	960.000	79	57
<i>Yoshida (1989)</i>	10-15	0'2	Fresco	4×10^5	8.000	55	<21
<i>Coy y cols., (1993b)</i>	10-15	2	Fresco	3×10^5	60.000	55'3	31'91
				6×10^5	120.000	71'6	37'73
				12×10^5	240.000	76'8	57'14

NOOC: N° de ovocitos por placa de cocultivo; VM: Volumen de medio de cocultivo; Fuente esperm: Fuente de espermatozoides utilizada; Esperm/ml: Espermatozoides por mililitro; Esperm/ovo: N° medio de espermatozoides por ovocito.

Tabla 6: Efecto del volumen de medio, de la concentración de espermatozoides y del número de ovocitos madurados in vitro durante el cocultivo usados por distintos investigadores.

NOOC: N° de ovocitos por placa de cocultivo; VM: Volumen de medio de cocultivo; Fuente esperm: Fuente de espermatozoides utilizada; Esperm/ml: Espermatozoides por

	NOOC	VM (ml)	Fuente esperm	Esperm/ml	Esperm/ovo	Parámetros de Fecundación	
						Penetrados (%)	Polispermicos (%)
<i>Mattioli y cols., (1989)</i>	10-15	2	Fresco	10^5	20.000	78	53
<i>Hamano y cols., (1989)</i>	10	0'1	Fresco	5×10^5	5.000	75	43
<i>Yoshida y cols., (1990)</i>	40-45	2	Fresco	5×10^5	25.000	85	63
<i>Rath (1992)</i>	5	0'04	Fresco	25×10^4	2.000	54'2	12'5
<i>Funahashi y cols. (1994a)</i>	10	0'1	Fresco	10^6	10.000	81	77
<i>Kano y cols., (1994)</i>	20-30	2	Fresco	10^5 10^6	10.000 100.000	95 100	93 99
<i>Kim y cols., (1997)</i>	10	0'1	Fresco	5×10^5	5.000	87	69
<i>Abeydeera y Day, (1997b)</i>	30-40	0'1	Criopr	10^5 5×10^5 10^6	300 1.600 3.300	39'9 83'5 86'9	16'2 57'2 64'4
<i>Wang y cols. (1998b)</i>	5-6	0'1	Criopr	5×10^5	10.000	97	65
<i>Abeydeera y cols. (1998d)</i>	35	0'1	Criopr	5×10^5	1.400	81	42'8
<i>Kikuchi y cols., (1999)</i>	10	0'1	Criopr	10^6	10.000	43'57	39'34
<i>Funahashi y cols., (1999)</i>	50	0'1	Fresco	10^6	2.000	92'7	47

mililitro; Esperm/ovo: N° medio de espermatozoides por ovocito; Criopr: Espermatozoides criopreservados-descongelados

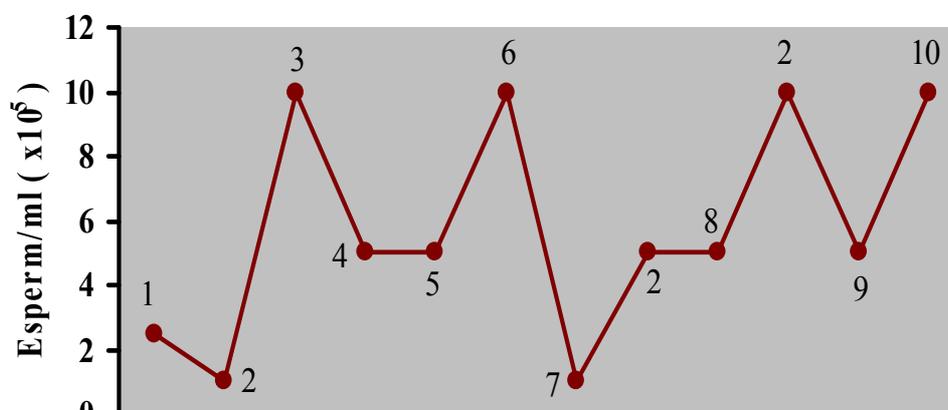


Figura 1: Efecto sobre el porcentaje de polispermia de diferentes concentraciones de espermatozoides/ml usadas por diferentes autores. 1) Rath, (1992); 2) Abeydeera y Day, (1997b); 3) Kikuchi y cols., (1999); 4) Abeydeera y cols., (1998d); 5) Hamano y cols., (1989); 6) Funahashi y cols., (1999); 7) Mattioli y cols., (1989); 8) Yoshida y cols., (1990); 9) Wang y cols., (1998b); 10) Funahashi y cols., (1994a).

Por otro lado, la incidencia y el grado de polispermia es una indicación del número de espermatozoides capacitados en la inmediata vecindad de los ovocitos ovulados y fecundados in vivo (Hunter y Nichol, 1988), o in vitro (Abeydeera y cols., 1997).

En contraste con las condiciones in vivo, un elevado número de espermatozoides está presente en el lugar de la fecundación y por tanto la probabilidad de penetraciones polispérmicas aumenta considerablemente (Hunter y Leglise, 1971). En 1973, Hunter, encontró más de 200 espermatozoides en la zona pelúcida de los ovocitos tras la fecundación in vitro, mientras que menos de 25 espermatozoides fueron encontrados tras la fecundación in vivo. Pese a la transcendencia de utilizar un número adecuado de espermatozoides durante el cocultivo, la mayoría de las investigaciones tan sólo reflejan la concentración espermática utilizada, independientemente del volumen de medio empleado y del número de ovocitos en el cocultivo. Bajo estas condiciones, es difícil

establecer comparaciones entre los resultados obtenidos en los distintos laboratorios (Tablas 5 y 6, Figura 1).

2.3.2.2.5. Efecto de la duración de cocultivo

Durante la fecundación in vivo, los espermatozoides de cerdo pueden alcanzar y penetrar la zona pelúcida de los ovocitos a las 2 horas de la inseminación artificial y pueden entrar al ooplasma 3 horas más tarde (Hunter y Dziuk, 1968). Durante la FIV, la penetración espermática ocurre a las 3-4 horas postinseminación con espermatozoides procedentes del eyaculado fresco (Kikuchi y cols., 1995; Martínez y cols., 1996).

Los tiempos de cocultivo utilizados en los diferentes laboratorios han variado entre 6 horas (Cheng y cols., 1986; Mattioli y cols., 1989; Yoshida, 1989) y 24 horas (Nagai y Moor, 1990). Cheng y cols., (1986) demostraron que los ovocitos expuestos a espermatozoides durante más de 8 horas sufrían un aumento significativo de penetraciones polispermicas. También Mattioli y cols., (1989), eliminando los espermatozoides adheridos a la zona pelúcida mecánicamente por sucesivos pipeteados tras 6-8 horas de cocultivo redujeron la incidencia de polispermia. Según Vázquez (1991) el porcentaje de espermatozoides capacitados que sufre la verdadera reacción acrosómica tras 2, 4 ó 6 horas de coincubación permanece constante con valores de 16-19%, lo cual implica que a mayor tiempo de coincubación aumenta la posibilidad de contactos efectivos entre los espermatozoides y ovocitos aumentando el riesgo de polispermia.

Con semen congelado, aunque la motilidad se reduce tras la criopreservación, la penetración in vitro comienza igual que in vivo; a las 3 horas postinseminación un 31% de los ovocitos son penetrados, alcanzando la máxima penetración (81%) a las 6 horas de la FIV, con un 39% de ovocitos polispermicos. Sin embargo, si se aumenta el periodo de cocultivo a 9 ó 12 horas, no se incrementan los porcentajes de penetración, pero si la polispermia (Abeydeera y Day, 1997b).

2.3.2.2.6. Preincubación de los espermatozoides con células oviductales

Las condiciones del útero y del oviducto de cerdas en celo son las más favorables para producir los cambios requeridos por los espermatozoides antes de su penetración en el interior de los ovocitos (Hunter, 1990).

La interacción entre los espermatozoides porcinos y/o los ovocitos madurados in vitro con las células oviductales antes y durante la FIV ha sido estudiado por Nagai y Moor, (1990). Estos autores muestran que las macromoléculas secretadas por el oviducto pueden reducir la incidencia de la polispermia interactuando con los espermatozoides más que con los ovocitos. Cuando los espermatozoides fueron preincubados durante 2'5 horas con células oviductales, el porcentaje de polispermia fue reducido a un 58% sin reducir el porcentaje de penetración (84%). Más tarde, Kano y cols., (1994), cocultivando en un medio condicionado con secreciones de células epiteliales oviductales, consiguieron reducir el número de espermatozoides por ovocito penetrado e incrementaron la incidencia de ovocitos monospermicos, lo cual podría indicar que diferentes factores solubles secretados al medio de cultivo por las células epiteliales oviductales podrían ser los responsables de modificar mediante algún mecanismo a los ovocitos y/o espermatozoides y disminuir las fecundaciones polispermicas y el número de espermatozoides por ovocito penetrado.

Se ha comprobado que las células oviductales tienen un efecto importante en la maduración de los espermatozoides, dando como resultado, su utilización in vitro, una reducida incidencia de polispermia y un incremento en la formación de pronúcleo masculino sin disminuir el porcentaje de ovocitos penetrados (Dubuk y Sirard, 1995).

La incidencia de la polispermia también se puede disminuir añadiendo al medio de cocultivo fluido oviductal obtenido durante el estro (Kim y cols., 1997).

2.3.2.2.7. Preincubación de los espermatozoides con fluido folicular porcino

Los estudios de Funahashi y Day (1993c) indican que cuando los espermatozoides se preincubaban durante 1'5 horas en el medio de fecundación (TCM-199 con 0'4% BSA) suplementado con 0'1% de FFp, se aumenta significativamente la incidencia de monospermia (64% frente al 23% del grupo control). Al aumentar la concentración de FFp a un 1%, sobre un 78% de ovocitos penetrados el 68% fueron monospérmicos. Sin embargo, el incremento de la concentración de FFp hasta el 10% resultó en un 87% de ovocitos penetrados monospérmicamente pero acompañado de una marcada reducción de la penetración (37%). Estos autores indicaron que la menor incidencia de polispermia era debida a una interacción entre el FFp y los espermatozoides, sugiriendo que la inducción de la reacción acrosómica por el FFp resultaba en una reducción del número de espermatozoides capaces de unirse a la zona pelúcida.

2.3.2.2.8. Adición al medio de cocultivo de otras sustancias

La unión de las glicoproteínas ligantes derivadas del fluido seminal (Mo y cols., 1991) y la proacrosina en el acrosoma del espermatozoide de verraco (Jones y Brown, 1987) con las glicoproteínas de la zona pelúcida se puede inhibir con la presencia de polímeros sulfatados, tales como el sulfato dextrano, el fucoídano, el polivinilsulfato y la heparina (Jones, 1991; Parry y cols., 1992). Más aún, los proteoglicanos sulfatados oviductales y foliculares en preincubación y/o en medio de fecundación, estimulan el porcentaje de espermatozoides capacitados y con reacción acrosómica, compiten con los receptores del espermatozoide para unirse a los ligantes de la zona pelúcida, y consecuentemente reducen el número de espermatozoides capacitados atacando la superficie de los ovocitos porcinos. Asimismo, la suplementación del medio de fecundación la secuencia de péptidos sintéticos RGD (Arg-Gly-Asp) conteniendo oligopéptidos (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro: GRGDSP), reduce la incidencia de polispermia sin reducir los porcentajes de fecundación (Yoshida y cols., 1993b). Varias fibronectinas derivadas de la secuencia RGD contienen péptidos que compiten con las interacciones espermatozoide-ovocito (Bronson y Fusi, 1990), por lo que pueden regular el número de espermatozoides capaces de unirse a los ovocitos. Sin embargo, la adición de estas sustancias no ha tenido mucho éxito en los sistemas de FIV porcinos por lo que actualmente no se utilizan.

2.4. Cultivo de embriones in vitro

El medio ambiente óptimo para el cultivo de los embriones porcinos es el propio tracto reproductivo de la cerda. Sin embargo, los embriones de cerdo pueden ser cultivados en tractos reproductivos de otras especies, como la oveja (Prather y cols., 1991) en cuyo oviducto los embriones en estadios tempranos pueden desarrollarse hasta el estadio blastocisto. Los primeros intentos de cultivar embriones porcinos in vitro fueron desalentadores al comprobar la existencia de un bloqueo en el estadio de 4 células. Este estadio es el más sensible y difícil de sobrepasar bajo condiciones in vitro. Sin embargo, en la última década se han formulado diferentes medios (Tabla 7) que permiten el desarrollo embrionario in vitro desde el estadio de 1-2 células hasta el estadio de blastocisto, tanto de embriones producidos in vivo como de embriones producidos a partir de ovocitos madurados y fecundados in vitro (revisado por Petters y Wells, 1993).

La adición de aminoácidos como la glutamina, la cual supone una fuente de energía, la taurina o la hipotaurina (Petter y Reed, 1991; Reed y cols., 1992) o el sorbitol como sustituto de éstas (NCSU-37; Petters y Wells, 1993) ha mejorado sustancialmente el desarrollo in vitro de embriones porcinos. También es conocida la importancia de la adición de BSA a los medios de cultivo, como suplemento de proteína, para la producción de embriones in vitro (Wright, 1977; Menino y Wright, 1982; Youngs y McGinnis, 1990; Beckmann y cols., 1990; Bavister, 1995).

Sin embargo, la eficiencia en el desarrollo embrionario in vitro es aún muy baja, incluso con métodos mejorados que promueven la formación pronuclear y la penetración monospermica (Funahashi y cols., 1994a,c). Efectivamente, se ha comprobado que los embriones producidos in vitro y transferidos, 6 horas después de la FIV, a oviductos de recipientes para su cultivo durante 5 días, presentan un mayor número de núcleos en su masa celular interna (más de 100 núcleos) (Funahashi y cols., 1994c) que cuando los embriones fueron cultivados in vitro durante dicho periodo (Wang y cols., 1997d; Funahashi y cols., 1994c; Wang y cols., 1999a). Recientemente se intenta mejorar las condiciones de cultivo in vitro mediante la adición de diferentes sustancias y mediante la sustitución de unos medios por otros durante el cultivo. Así, se ha comprobado que

reemplazar BSA por FCS en el medio BECM-3 el día 5 de cultivo (Dobrinsky y cols., 1996) o transferir embriones procedentes del medio CZB al medio esencial mínimo de Eagle modificado, conteniendo un 20% FCS (Pollard y cols., 1995), mejora la incidencia de blastocistos eclosionados e incrementa su número de células.

Tabla7: Medios usados para el cultivo in vitro de embriones porcinos

MEDIOS	AUTORES
Whitten's ¹	Whitten y Biggers (1968)
BMOC-2 ²	Brinster (1969)
MKRB ³	Davis y Day (1978)
NCSU-6 ⁴	Petters y cols., (1990)
CZB ⁵	Chatot y cols., (1989); Misener y cols., (1991)
TLH ⁶	Hagen y cols., (1991)
NCSU-37	Petters (1992)
NCSU-23	Petters y Reed (1991); Petters (1992)
ISU ⁷	Youngs y cols., (1993)
BECM-3 ⁸	Dobrinsky y cols., (1996)

¹: Modificado posteriormente por Wright, (1977); Beckmann y Day (1993); French y cols.,(1993); Youngs y McGinnis (1990); Youngs y cols., (1993). ²: Brinster Modified Oocyte Culture Medium ³: Krebs Ringer Bicarbonate. ⁴: North Carolina State University. ⁵: Chalot-Ziomek-Bavister. ⁶: Tyrode's Hepes. ⁷: Iowa State University. ⁸: Beltsville Embryo Culture Medium.

2.4.1. Progresos en el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto

Aunque, como queda reflejado en esta revisión, son muchos los trabajos encaminados a mejorar los sistemas de MIV y FIV con la finalidad de obtener un porcentaje aceptable de penetración y monospermia, actualmente el control más fiable

para detectar la influencia de los diferentes tratamientos utilizados es determinar el porcentaje de blastocistos obtenidos tras 6 días de cultivo in vitro. En las tablas 8 y 9 se refleja la situación actual de los diferentes sistemas de MIV/FIV/CIV en cuanto a la producción de blastocistos.

Como se puede observar, se ha conseguido aumentar la incidencia del desarrollo de embriones procedentes de ovocitos madurados y fecundados in vitro hasta el estadio de blastocisto, cultivando en fluido amniótico de embriones de pollo (Ocampo y cols., 1994) y cocultivo con células del cúmulus porcinas (Nagai y Takahashi, 1992), células trofoblásticas (Nagai y Takahashi, 1992) o agregados de células epiteliales oviductales (Choi y cols., 1995). La división de los embriones también ha sido incrementada adicionando glicina y células oviductales en el medio durante el desarrollo temprano de los embriones (Xia y cols., 1995).

Tabla 8 Avances en la formación de blastocistos de embriones madurados y fecundados in vitro. Sistemas de co-cultivo y sistemas in vivo.

	% Blastocistos	Modificaciones
<i>Nagai y Takahashi (1992)</i>	10	Cocultivo de embriones MIV-FIV con células del cúmulus en medio BMOCII m
<i>Ocampo y cols., (1994)</i>	26	Cultivo de embriones MIV-FIV con fluido amniótico en embriones de pollo
<i>Abeydeera y cols., (1998a)</i>	36	Cocultivo de COC con FSP durante la MIV
<i>Choi y cols., (1995)</i>	11	Cocultivo de embriones con agregados de células oviductales epiteliales

COC: complejos cúmulus-ovocito; FSP: células de la granulosa y de la teca

Tabla 9: Avances en la formación de blastocisto de embriones madurados y fecundados in vitro. Sistemas simples de cultivo.

	% Blastocistos	Modificaciones
<i>Gruppen y cols.,</i>	1	Control

	% Blastocistos	Modificaciones
<i>(1995)</i>	12	Suplementación del medio de MIV con 500µM cisteamina
<i>Funahashi y cols., (1997a)</i>	9	Control
	23	Preincubación en medio de maduración 12 horas sin gonadotropinas
<i>Funahashi y cols., (1997b)</i>	9	Control
	22	cAMP+gonadotropinas las primeras 20 horas de maduración
<i>Funahashi y cols., (1997c, 1999)</i>	22	Control
	34	dbcAMP + gonadotropinas durante las primeras 20 horas y TIMP-1 las últimas 20 horas de MIV
<i>Xia y cols., (1994)</i>	2	Control
	21	25 ng de IGF-I, también glicina y células oviductales.
<i>Funahashi y cols., (1996a)</i>	4	Control
	8	Suplementando el medio de MIV con ósmoles orgánicos
<i>Abeydeera y cols., (1998b)</i>	26	Control
	34	MIV con 12'5µM β -Mercaptoetanol
	41	MIV con 25µM β -Mercaptoetanol
<i>Abeydeera y cols., (1998c)</i>	21	Control
	33	MIV en NCSU-23 + 10% FFp con 1 ng/ml EGF
	42	MIV en NCSU-23 + 10% FFp con 10 ng/ml EGF
<i>Abeydeera y cols., (1999)</i>	22	Control
	37	MIV en TCM-199 + 0'1% PVA con 10 ng/ml EGF

Por otra parte, la capacidad de desarrollo de embriones procedentes de ovocitos madurados y fecundados in vitro en un medio simple hasta el estadio de blastocisto ha ido mejorando por modificaciones en el medio de maduración, tales como la reducción de la

concentración de cloruro de sodio (Funahashi y cols., 1994b), o la suplementación del medio de maduración con cisteamina (Gruppen y cols., 1995) u osmolitos orgánicos (Funahashi y cols., 1996), factores de crecimiento (Abeydeera y cols., 1998c; 1999; Xia y cols., 1994), aumentando el GSH con β -Mercaptoetanol (Abeydeera y cols., 1998b), así como por las modificaciones destinadas a sincronizar meióticamente los ovocitos puestos a cultivar, con la adición de dbcAMP (Funahashi y cols., 1997bc), o con la presencia de Tissue inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1 (TIMP-1) las últimas 20 horas de MIV (Funahashi y cols., 1997c; 1999) y con preincubación en medio sin gonadotropinas (Funahashi y cols., 1997a). Mas aún, la adición de IGF-I, el cual está presente en el fluido oviductal porcino (Wiseman y cols., 1992), al medio de maduración y de cultivo de embriones aumenta el porcentaje de embriones divididos y de blastocistos tras la maduración y fecundación in vitro (Xia y cols., 1994; 1995), y tiene un efecto estimulante en el metabolismo y la proliferación celular de los blastocistos porcinos (Lewis y cols., 1992).

Pese a todos estos avances, la elevada incidencia de penetración polispérmica y las deficiencias señaladas en el desarrollo embrionario in vitro todavía persisten en la actualidad, lo que motiva la aplicación limitada de estos sistemas para otras biotecnologías.

Material y Métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Material animal

Los ovocitos utilizados para la realización del presente trabajo se obtuvieron a partir de ovarios de cerdas prepuberales sacrificadas en un matadero industrial, con un peso comprendido entre 90 y 100 Kg. El criterio de selección de los ovarios se basó en la presencia de folículos antrales de 3 a 6 mm de diámetro, siendo rechazados aquellos que presentaban cuerpos lúteos o algún tipo de alteración morfológica macroscópica.

Se utilizó semen criopreservado a partir de los eyaculados obtenidos de dos verracos híbridos, de fertilidad conocida, seleccionados previamente en base a la capacidad fecundante de sus espermatozoides y posterior desarrollo embrionario in vitro hasta el estadio de blastocisto.

3.1.2. Reactivos químicos y suplementos

Todos los medios, suplementos y hormonas utilizados en este trabajo fueron de la marca Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO. USA; Alcobendas, M. España), excepto el medio M199 (Gibco, Grand Island, NY. USA), el medio PBS de Dulbecco (PBS-D; Gibco BRL), el aceite mineral (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA. USA) y el Tris (Fisher).

3.1.3. Condiciones de cultivo

Todos los cultivos se desarrollaron bajo una atmósfera controlada de temperatura, humedad y CO₂ en aire en un incubador de CO₂ BB-16 de Heraeus Instruments.

3.1.4. Medios utilizados

Los medios de cultivo fueron preparados con agua bidestilada y purificada (Elgastat UHQ ps, Elga). Los medios se esterilizaron en un ambiente controlado (cámara de flujo laminar horizontal, BH-100 de Telstar) con filtros de membrana de diámetro de poro de 0,22 µm (Sterivex GP, Millipore) mediante la ayuda de un equipo de filtración Steritop (Millipore). El pH (pH Crison 2000) y la osmolaridad (Microosmómetro Model 2-MO plus; Advanced Instruments Inc., USA) de cada medio fueron controlados en todos y cada uno de los ensayos realizados en las diferentes experiencias.

3.1.4.1. Medio de transporte y lavado de ovarios (MT)

El medio utilizado para el transporte de los ovarios desde el matadero hasta el laboratorio fue una solución salina (0,9% ClNa) suplementada con penicilina G potásica (75 µg/ml) y sulfato de estreptomicina (50 µg/ml).

3.1.4.2. Medio de lavado de ovocitos (MLO)

Para la recolección, lavado y manipulación de los ovocitos ha sido utilizada la solución TALP-HEPES-PVA (Bavister, 1989), cuya composición se indica en la tabla 10. El pH del medio se ajustó a 7,4 y después de la esterilización y distribución en frascos de 500 ml, el medio se conservó a 5°C durante un tiempo máximo de 15 días.

Tabla 10: Composición del medio TALP-HEPES-PVA (Bavister, 1989)

Componentes	Concentración
ClNa (mM)	114
ClK (mM)	3'20
CO ₃ HNa (mM)	2
PO ₄ HNa (mM)	0'34
Lactato de sodio (mM)	10
ClMg-6H ₂ O (mM)	0'50
Cl ₂ Ca-2H ₂ O (mM)	2
Sorbitol (mM)	12
HEPES (mM)	10
Piruvato de sodio (mM)	0'20
Gentamicina (μg/ml)	25
Penicilina G potásica (μg/ml)	65
PVA* (g/l)	0'10

*Polivinil-alcohol

3.1.4.3. Medio de maduración in vitro (MM)

El medio utilizado para la maduración in vitro de los ovocitos fue el medio TCM-199 con sales de Earle y con 2'20 g/l de CO₃HNa, modificado como se indica en la tabla 11 (TCM-199m: Abeydeera y cols., 1998d, 1999). Una vez preparado se procedió a su filtración, conservándose en refrigeración a 5°C hasta el momento de su uso, durante un tiempo máximo de 15 días.

En el momento de su utilización, el TCM-199m fue suplementado como se expone en la tabla 12, constituyendo el medio de maduración in vitro (MM). Una vez suplementado se esterilizó por filtración y se depositó en las placas de cultivo.

Tabla 11: Modificación del medio TCM-199 (Abeydeera y cols., 1999)

Componentes	Concentración
D-Glucosa (mM)	3'05
Piruvato de sodio (mM)	0'91
PVA* (%)	0'10

* Polivinil-alcohol

Tabla 12: Suplementación del TCM-199m

Componentes	Concentración
L-Cisteina (mM)	0'57
LH ($\mu\text{g/ml}$)	0'50
FSH ($\mu\text{g/ml}$)	0'50
EGF* (ng/ml)	10

* Factor de crecimiento epidérmico

3.1.4.4. Medio de lavado de los espermatozoides (MLE)

El medio utilizado para el lavado de los espermatozoides fue PBS-D, al que se le añadió penicilina G potásica ($75\mu\text{g/ml}$) y sulfato de estreptomina ($50\mu\text{g/ml}$). Tras la esterilización, el medio se conservó a 5°C durante un periodo máximo de 15 días.

En el momento de su utilización, se suplementó con 0'1% de BSA (Fracción V), se ajustó el pH a 7'2 y se esterilizó por filtración.

3.1.4.5. Medio de fecundación in vitro (MF)

El medio de fecundación in vitro utilizado fue el Tris-Buffered modificado (TBMm; Abeydeera y Day, 1997b), cuya composición se indica en la tabla 13. Tras su preparación se esterilizó y se conservó a 5°C durante un tiempo máximo de 15 días.

Tabla 13: Composición del medio TBMm (Abeydeera y Day, 1997b)

Componentes	Concentración (mM)
CINa	113'10

ClK	3
Cl ₂ Ca-2H ₂ O	7'50
Tris*	20
Glucosa	11
Piruvato de sodio	5

* Crystalized free base

En el momento de su utilización, se suplementó con 2mM de cafeína y 0'2% de BSA (Fracción V). Una vez suplementado se esterilizó por filtración y se depositó en las placas de cocultivo.

3.1.4.6. Medio de cultivo in vitro de embriones (MCE)

El medio utilizado para el CIV de los embriones fue el NCSU 23 (Petters y Wells, 1993) cuya composición se indica en la tabla 14. Una vez preparado se ajustó el pH a 7'4, se esterilizó y se distribuyó en alicuotas de 50 ml, conservándose en refrigeración a 5°C por un tiempo máximo de 15 días.

En el momento de su utilización, el medio se suplementó con 0'4% BSA (Fracción V), se esterilizó por filtración y se depositó en las placas de cocultivo.

Tabla 14: Composición del medio NCSU23 (Petters y Wells, 1993)

Componentes	Concentración
ClNa (mM)	108'73

ClK (mM)	4'78
Cl ₂ Ca-2H ₂ O (mM)	1'70
PO ₄ H ₂ K (mM)	1'19
SO ₄ Mg-7H ₂ O (mM)	1'19
CO ₃ HNa (mM)	25'07
Glucosa (mM)	5'55
L-Glutamina (mM)	1
Taurina (mM)	7
Hipotaurina (mM)	5
Penicilina G potásica (µg/ml)	75
Sulfato de estreptomina (µg/ml)	50

3.2. Métodos

3.2.1. Criopreservación de los espermatozoides

Para la realización de este trabajo se ha utilizado semen criopreservado mediante dos procedimientos diferentes:

3.2.1.1. *Criopreservación en forma de píldoras (Método A)*

El método seguido de criopreservación espermática en forma de píldoras fue el descrito por Pursel y Johnson (1975) y Wang y cols., (1991) con algunas modificaciones. La fracción rica del eyaculado recogida por el método manual, se sometió a un primer equilibrado de 60-90 minutos a temperatura ambiente (25°C), tras el cual, 5 ml de semen se diluyeron 1:2 con diluyente Hulsenberg VIII (Tabla 15; Richter, 1975) en tubos de 15 ml, procediéndose, a continuación, a su centrifugación a 100 x g durante 3 minutos para eliminar el plasma seminal. El sobrenadante se diluyó de nuevo con el mismo medio 1:2 y se centrifugó a 1900 x g durante 10 minutos. Tras descartar el sobrenadante, el pellet resultante se resuspendió en diluyente BF5 (Tabla 16; Pursel y Johnson, 1975), a temperatura ambiente hasta obtener una concentración de 5-10 x 10⁸ espermatozoides/ml. Las muestras resuspendidas se enfriaron en una vitrina térmica a 5°C, en tubos de cristal

introducidos en agua, durante 90 minutos. Posteriormente, las muestras se diluyeron 1:2 en BF5 conteniendo 2% de glicerol a 5°C y rápidamente se congelaron en píldoras de 0'1 ml en nieve carbónica, almacenándose a continuación en nitrógeno líquido.

Tabla 15: Composición del medio Hulsenberg VIII (Richter, 1975)

Componentes	Concentración
Glucosa (mM)	319
β-Lactosa (mM)	7'30
Citrato trisódico dihidratado (mM)	15'30
EDTA* (sal disódica) (mM)	9'40
CO ₃ HNa (mM)	14'28
CIK (mM)	5'40
Penicilina (μg/ml)	65
Gentamicina (μg/ml)	25

* Ácido etiléndiamino tetra-acético

Tabla 16: Composición del medio BF5 (Pursel y Johnson, 1975)

Componentes	Concentración
TES (mM)	52'36
Tris* (mM)	16'51
Glucosa (mM)	177'58
Orvus Es paste (Equex STM) (ml)	5
Yema de huevo fresca (ml)	200
CIK (mM)	5'40
Penicilina (μg/ml)	65
Gentamicina (μg/ml)	25

*Cristalized free base

En el momento de la descongelación, la píldora se sumergió en un tubo con 10 ml de MLE atemperado a 37°C. En cada descongelación se utilizó sólo una píldora.

3.2.1.2. Criopreservación en forma de pajuelas (Método B)

El semen fue procesado para su congelación por un procedimiento modificado basado en el método originalmente descrito por Westendorf y cols., (1975), con las modificaciones señaladas por Maxwell y Johnson (1997), y adaptado para utilizar pajuelas de 0'5 ml (Rodríguez, 1999).

La fracción rica del eyaculado recogida por el método manual, se diluyó inmediatamente 1:2 en diluyente BTS (Beltsville Thawing Solution; Pursel y Johnson, 1975) (Tabla 17) a la misma temperatura (30-35°C) y se equilibró durante 210 minutos en una vitrina térmica a 17°C de temperatura. Posteriormente, las muestras espermáticas se centrifugaron a 800 x g durante 10 minutos. Los pellets resultantes se diluyeron en diluyente LEY (Lactosa-Yema; Westendorf y cols., 1975; Tabla 18) hasta alcanzar una concentración de $1'5 \times 10^9$ espermatozoides/ml. Una vez diluido el semen en este medio, se procedió a su enfriamiento en la vitrina térmica hasta 5°C, en tubos de cristal introducidos en agua, durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo, se le añadió el diluyente LEYGO (LEY-Glicerol-Orvus Es Paste; Westendorf y cols., 1975; Tabla 19) hasta alcanzar una concentración final de 1×10^9 espermatozoides/ml. Inmediatamente después y dentro de la vitrina térmica a 5°C, las muestras seminales diluidas fueron dispensadas manualmente en pajuelas de 0'5 ml y selladas mediante el empleo de una selladora automática.

La congelación de las pajuelas se realizó en dos rampas de congelación. En la primera rampa, las pajuelas se sometieron al efecto de los vapores de nitrógeno líquido utilizando una caja de poliespán. Las pajuelas se colocaron a unos 4 cm de la superficie del nitrógeno líquido, de forma que la exposición a los vapores fuera uniforme. Así, se consiguió una temperatura de -105°C en 20 minutos de exposición. Tras este periodo de tiempo, las pajuelas se sometieron a la segunda rampa de congelación, para lo cual se sumergieron por completo en el interior del nitrógeno líquido a -196°C, procediéndose, por último, a su almacenamiento en un tanque de nitrógeno líquido.

Tabla 17: Composición del medio BTS (Beltsville Thawing Solution, Pursel y Johnson, 1975)

Componentes	Concentración
-------------	---------------

Glucosa (mM)	205
Citrato sodico (mM)	20'39
CO ₃ HNa (mM)	15'01
EDTA* (mM)	3'35
ClK (mM)	5'40
Kanamicina (mg/l)	50

*Ácido etilendiamino tetra-acético

Tabla 18: Composición del medio LEY (Westendorf y cols., 1975)

Componentes	Concentración
β-Lactosa (mM)	310
Yema de huevo fresca (%)	20
Kanamicina (mg/l)	100

Tabla 19: Composición del medio LEYGO (Westendorf y cols., 1975)

Componentes	Concentración (%)
LEY	89'50
Orvus Es paste (Equex STM)	1'50
Glicerol	9

Cada descongelación fue efectuada utilizando una pajuela, la cual fue sumergida en agua en el interior de un baño maría a 37°C, y agitada de forma suave y constante durante 20 segundos. Pasado este tiempo, se procedió al secado completo de la pajuela y a depositar su contenido en un tubo graduado de cristal. Sólo se utilizaron 0'1 ml de semen descongelado que se diluyeron hasta 10 ml con MLE atemperado a 37°C.

3.2.2. Obtención y maduración in vitro de los ovocitos

Los ovarios de hembras prepuberales sacrificadas en matadero se transportaron al laboratorio en MT a 25-30°C, empleando un tiempo máximo desde la obtención de los ovarios hasta la llegada al laboratorio de 1 hora. Se utilizaron al menos 50 ovarios para cada replicado (Foto 1a).

En el laboratorio, los folículos antrales de tamaño medio (3-6 mm de diámetro) se aspiraron con una aguja de 18 g unida a una jeringuilla de 10 ml (Foto 1b). El líquido folicular con los ovocitos se introdujo en tubos de 50 ml para proceder a su sedimentación durante 15 minutos (Foto 1b). Pasado este tiempo se eliminó el sobrenadante y el sedimento resultante compuesto por ovocitos y células foliculares se resuspendieron en MLO a 25-30°C, trasladando el contenido del tubo a las placas de Petri en las cuales se procedió a la identificación y selección de los ovocitos inmaduros con la ayuda de un estereomicroscopio (SMZ-2T Nikon) (Foto 1c). Los ovocitos rodeados al menos por dos capas de células del cúmulus y con ooplasma uniforme (Foto 1d,e) fueron lavados tres veces en MM y depositados en placas multidish de 4 pocillos (Foto 2a) (Nunc, Roskilde, Dinamarca) para su maduración in vitro (Foto 2b). Se han utilizado grupos de 40-50 ovocitos en microgotas de 500 µl de MM, previamente cubiertas con aceite mineral y equilibradas durante 3 horas en el incubador bajo una atmósfera del 5% de CO₂ en aire, 39°C de temperatura y 95-100% de humedad relativa. Los ovocitos fueron incubados durante 40-48 horas a 39°C, 5% de CO₂ en aire y humedad a saturación. El tiempo medio de manipulación de los ovocitos en el laboratorio hasta su cultivo en MM fue de 1'5-2 horas.

3.2.3. Fecundación in vitro

Una vez finalizado el periodo de maduración, los ovocitos, excepto en la experiencia 3, fueron desnudados con 0'1% de hialuronidasa en MM, por agitación en vórtex y con la ayuda de una pipeta Pasteur adelgazada (Foto 2c). Posteriormente, los ovocitos fueron lavados tres veces y colocados, 30 minutos antes de fecundar, en las gotas de MF, previamente cubiertas con aceite mineral y equilibradas durante 24-48 horas bajo una atmósfera del 5% de CO₂ en aire, 39°C de temperatura y 95-100% de humedad relativa, utilizando placas de cultivo de 6 pocillos (Corning; Foto 3a) o de 35x10 mm² (Nunc; Foto 3b).

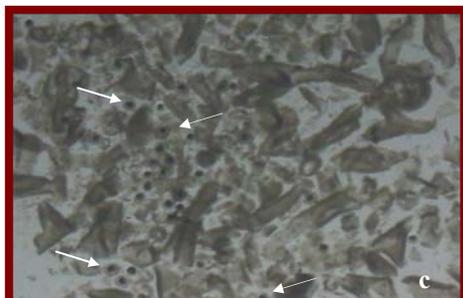
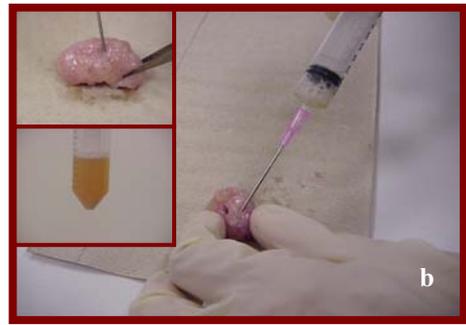


Foto 1. Preparación de los ovocitos para su maduración in vitro. a) Ovarios de cerdas prepuberales sacrificadas en el matadero; b) Aspiración de los folículos antrales (3–6 mm de diámetro) y sedimentación del contenido folicular en tubos de 50 ml; c) Contenido folicular visto bajo el estereomicroscopio; nótese la presencia de ovocitos inmaduros rodeados por las células del cúmulus (flechas); d) Ovocitos inmaduros rodeados por al menos dos capas de células del cúmulus seleccionados para su maduración in vitro; e) Ovocitos inmaduros no utilizados por su escasa calidad (flechas).



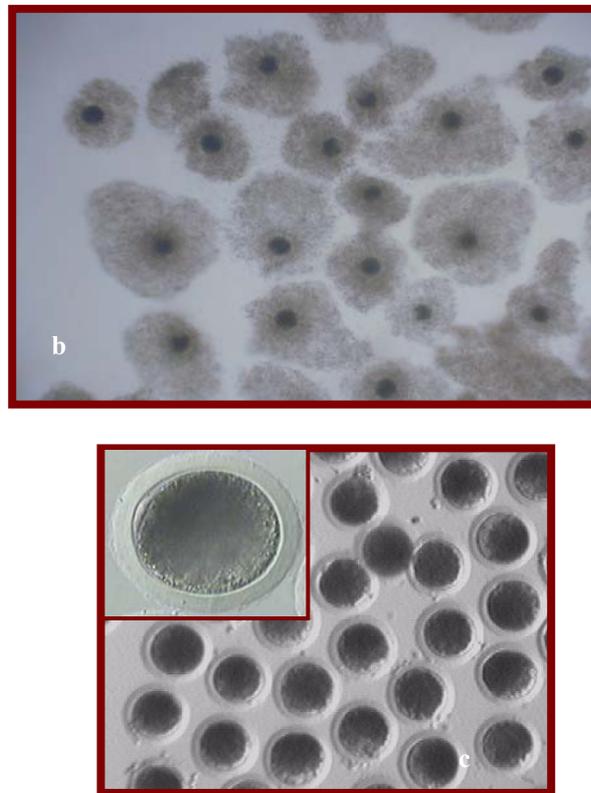


Foto 2. Maduración in vitro de los ovocitos: a) placas de Petri utilizadas para el lavado de los ovocitos (imagen superior) y para su maduración in vitro (imagen inferior); b) ovocitos durante el proceso de maduración in vitro, donde se puede apreciar la expansión de las células del cúmulus; c) ovocitos preparados para su fecundación in vitro, tras la eliminación de las células del cúmulus. Sólo en la experiencia 3 se inseminaron ovocitos rodeados por dichas células.

El volumen de medio (VM), el número de ovocitos en el cocultivo (NOOC) y el tiempo de cocultivo varió en las diferentes experiencias, manteniéndose constante la atmósfera de cocultivo (5% de CO₂, 39°C y 95-100% de humedad).

El semen criopreservado/descongelado, con una motilidad postdescongelación del 50-60%, se lavó tres veces en MLE por centrifugación a 1900 x g durante 3 minutos. Al finalizar los lavados, el pellet resultante de espermatozoides se resuspendió en MF de forma que 50 µl de la resuspensión con la concentración de espermatozoides deseada se

adicionaron a las microgotas del medio con los ovocitos. Justo antes de la fecundación se valoró la motilidad de los espermatozoides, colocando una gota de la suspensión espermática sobre un porta y por visualización en un microscopio. Sólo se utilizaron aquellas muestras que presentaron una motilidad superior al 25%.

3.2.4. Cultivo in vitro de los embriones

Finalizado el tiempo de cocultivo, los ovocitos fueron lavados tres veces en MCE y colocados en una placa multidish de 4 pozillos (Nunc) (Foto3c), para su desarrollo embrionario. En cada pocillo se incubaron grupos de 20-30 ovocitos en 500 µl de MCE, cubierto por aceite mineral y equilibrado previamente 3 horas en el incubador con una atmósfera del 5% de CO₂ en aire, 39°C de temperatura y 95-100% de humedad relativa. Doce horas después de la FIV, algunos ovocitos se fijaron y tiñeron para valorar los parámetros de fecundación. El resto de los ovocitos se cultivaron hasta un máximo de 7 días para analizar el desarrollo embrionario.

3.2.5. Valoración de los parámetros de fecundación (PF)

Para valorar los parámetros de fecundación, algunos ovocitos se lavaron en MLO y se situaron en microgotas de medio (1 ovocito/microgota) en un portaobjetos, sobre el cual previamente se habían colocado dos líneas paralelas de vaselina, depositando un total de 10 embriones por portaobjeto. Inmediatamente, se colocó un cubreobjeto sobre el portaobjeto, presionando suavemente hasta que aquel contactó con las microgotas. Los ovocitos se fijaron en 25% (v:v) de ácido acético en etanol, a temperatura ambiente, durante un tiempo de 48-72 horas, tras el cual se tiñeron con un 1% de lacmoid en 45% (v:v) de ácido acético en agua purificada (Chang, 1952) y se examinaron en un microscopio de contraste de fases utilizando para ello los objetivos de 20 y de 40 aumentos.

Los parámetros de fecundación estudiados fueron los siguientes:

- Ovocitos penetrados: porcentaje de ovocitos maduros nuclearmente que fueron penetrados por 1 ó más espermatozoides. Un ovocito se consideró penetrado cuando

se observaron en su interior los dos corpúsculos polares, el pronúcleo femenino, cabezas espermáticas descondensadas y/o pronúcleos masculinos, con sus correspondientes flagelos espermáticos (Foto 4).

- Ovocitos monospermicos: porcentaje de los ovocitos que presentaron un pronúcleo femenino, un pronúcleo masculino y los dos corpúsculos polares sobre el total de ovocitos penetrados.
- Espermatozoides/ovocito: número medio de espermatozoides, en cualquier estadio de descondensación, por ovocito penetrado.
- Rendimiento o eficiencia de la fecundación: porcentaje de ovocitos penetrados monospermicamente sobre el total de ovocitos analizados.

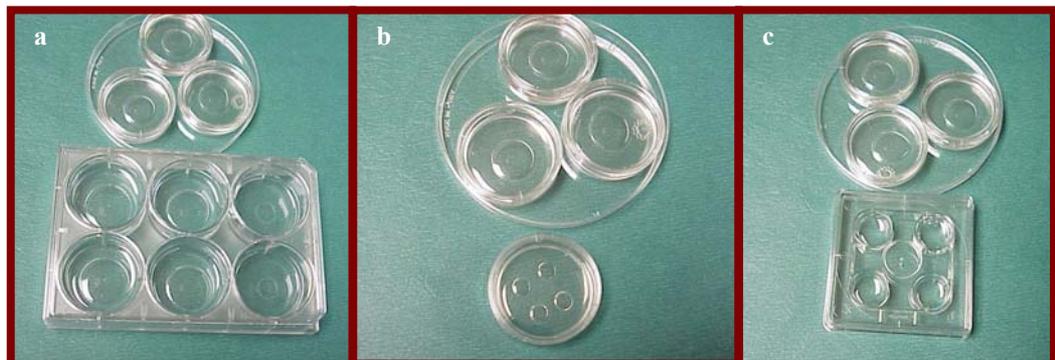


Foto 3. Placas de lavado (arriba) y de cultivo (abajo) utilizadas para la fecundación in vitro (a: experiencias 1 y 2; b: experiencias 3 y 4) y para el desarrollo in vitro de los embriones (c).

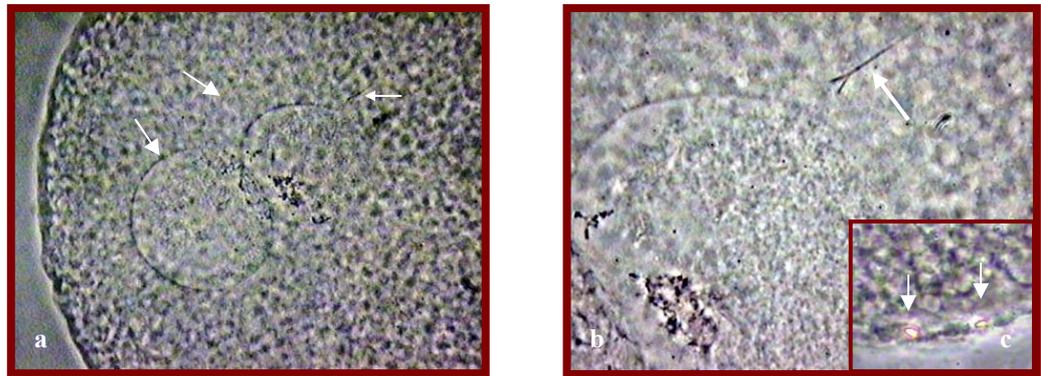


Foto 4. Ovocito monospermico: a) dos pronúcleos (flechas grandes) y el flagelo espermático (flecha pequeña); b) Detalle del flagelo espermático (flecha); c) Presencia de los corpúsculos polares (flechas) en el mismo ovocito de la imagen.

3.2.6. Valoración del desarrollo embrionario (DE)

La valoración del desarrollo embrionario se efectuó a las 48 horas y a las 144-168 horas de cultivo, mediante la visualización de los embriones en un estereomicroscopio.

Los parámetros evaluados fueron:

- División: porcentaje de ovocitos que a las 48 horas de la fecundación estaban divididos en 2 ó 4 células y que además presentaban apariencia normal y uniforme en cuanto al tamaño, forma y coloración oscura de cada una de las células (Foto 5a).

- Blastocistos: porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadio de blastocisto a las 144-168 horas, considerando sólo aquellos embriones en estadio de blastocisto temprano, expandido o eclosionado, que presentaban una forma y coloración adecuada y además con masa celular interna visible (Foto 5b).

3.2.7. Tinción y conteo de espermatozoides adheridos a la zona pelúcida

Para contar el número de espermatozoides adheridos a la zona pelúcida, los ovocitos fueron teñidos con Hoechst-33342 ($6'23\mu\text{M}$ en MCE) durante 5-10 minutos a 37°C . En un portaobjeto, preparado previamente con dos líneas paralelas de vaselina, se depositaron 5 microgotas de medio de montaje (Glicerol:PBSD 3:1, conteniendo $2'5$ mg/ml de azida sódica). Transcurrido el tiempo de incubación se situó un ovocito teñido, en cada microgota de medio de montaje. Se colocó un cubreobjetos sobre el portaobjetos y se observó inmediatamente en un microscopio de fluorescencia con los objetivos de 20x y 40x. Los espermatozoides adheridos a la zona pelúcida presentaban fluorescencia de color azul brillante (Foto 6).

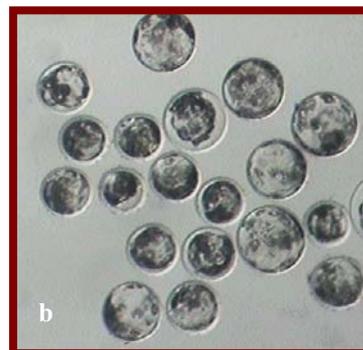


Foto 5. Embriones divididos a las 48 horas de la fecundación in vitro (a) y embriones en estadio de blastocisto tras 144-168 horas de cultivo in vitro (b).

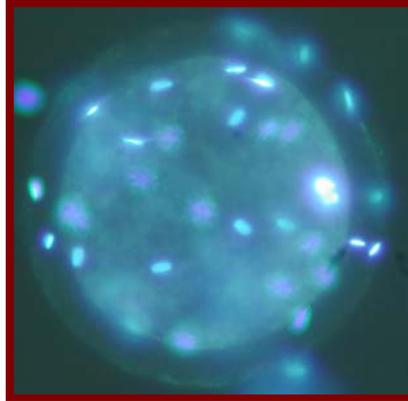


Foto 6. Espermatozoides teñidos con Hoechst 33342 adheridos a la zona pelúcida de un ovocito durante el cocultivo. Obsérvese la presencia de otros espermatozoides en diferentes campos ópticos.

3.3. Diseño del trabajo experimental

El trabajo experimental se planificó en cuatro experiencias.

3.3.1. Experiencia 1: Efecto del volumen de cocultivo y del número de ovocitos durante el cocultivo sobre los parámetros de fecundación, utilizando una concentración constante de espermatozoides

En esta experiencia se estudió el efecto de tres volúmenes de medio de cocultivo (2 ml, 1 ml y 0,1 ml) y de tres números de ovocitos en el cocultivo (50, 30 y 15 ovocitos) sobre los parámetros de fecundación, utilizando una concentración constante de

espermatozoides de $6 \times 10^5/\text{ml}$, mediante un experimento factorial 3×3 , siguiendo el diseño representado en la figura 2. Los espermatozoides utilizados en esta experiencia fueron congelados y descongelados por el método A, citado anteriormente, y procedieron todos de un mismo eyaculado. El tiempo de contacto espermatozoides-ovocitos fue de 6 horas.

3.3.2. Experiencia 2: Efecto del volumen de cocultivo y del número de ovocitos durante el cocultivo sobre los parámetros de fecundación y desarrollo embrionario, utilizando un ratio espermatozoides:ovocito de 2.000:1

En esta experiencia se estudió el efecto de tres volúmenes de medio de cocultivo (2 ml, 1 ml y 0,1 ml) y de tres números de ovocitos en el cocultivo (50, 30 y 15 ovocitos) sobre los parámetros de fecundación y desarrollo embrionario, utilizando un ratio espermatozoides:ovocito de 2.000:1, mediante un experimento factorial 3×3 , siguiendo el diseño representado en la figura 3. Como en la experiencia 1, los espermatozoides fueron congelados y descongelados por el método A, utilizándose el mismo eyaculado que en la experiencia anterior. El tiempo de contacto espermatozoides-ovocitos fue de 6 horas.

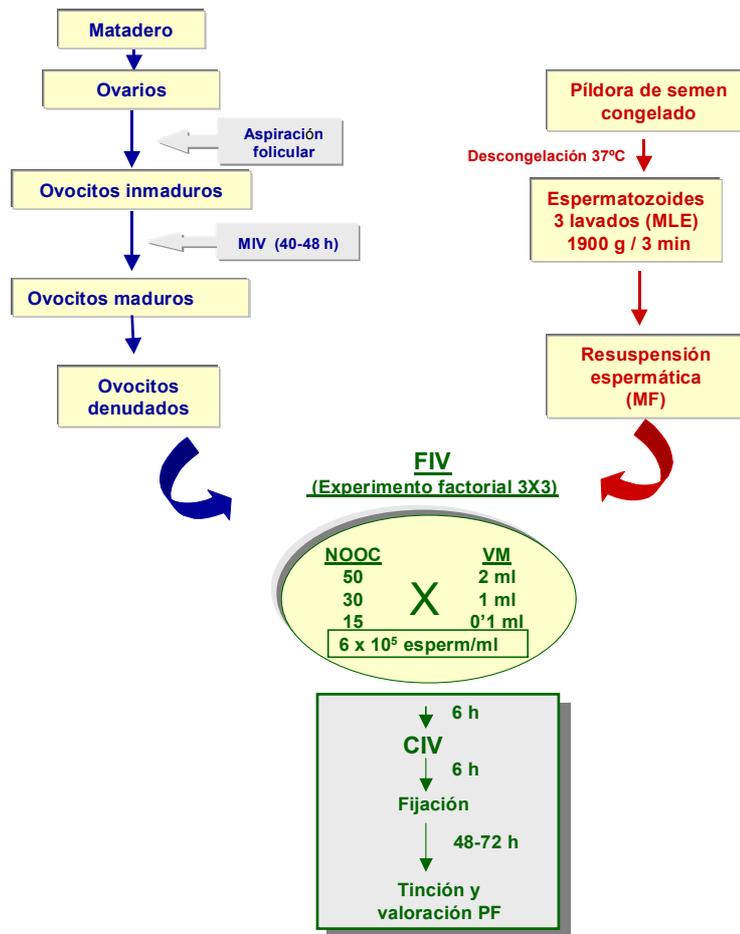


Figura 2. Representación esquemática del diseño experimental seguido en la experiencia 1.

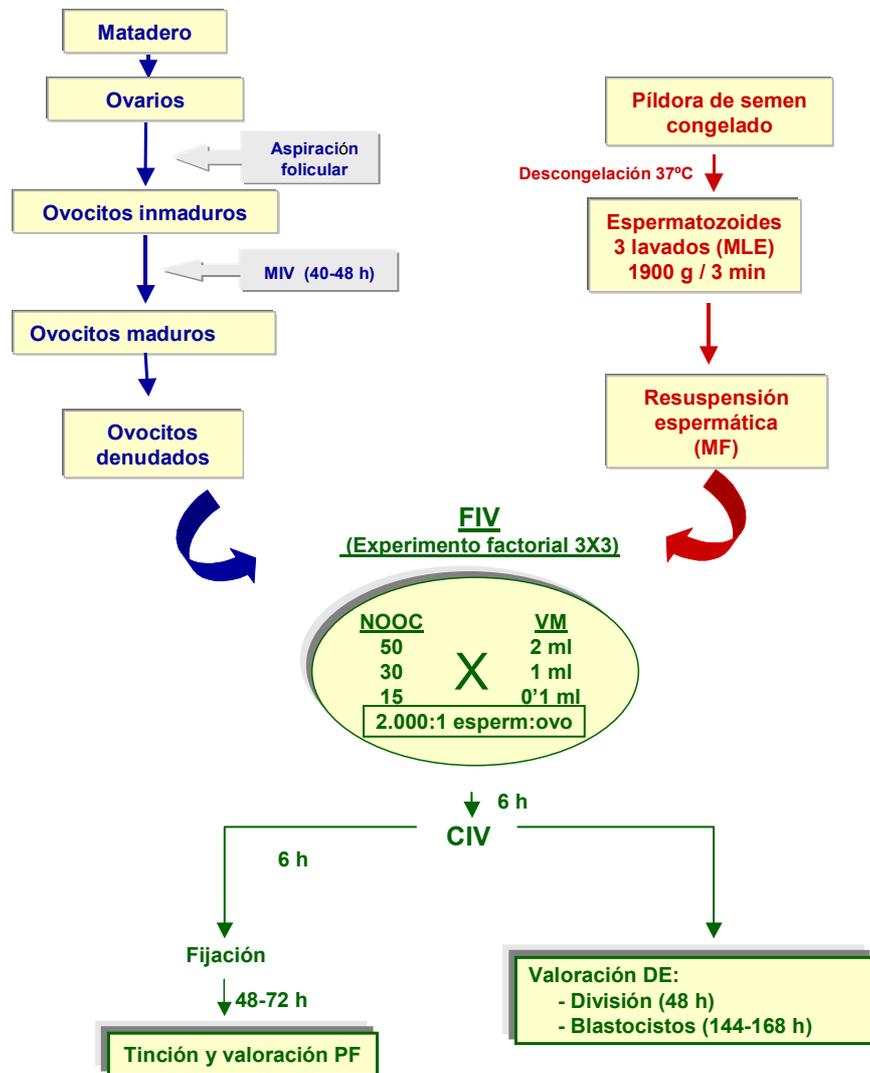


Figura 3. Representación esquemática del diseño experimental seguido en la experiencia 2.

3.3.3. Experiencia 3: Efecto de la presencia de células del cúmulus durante la fecundación in vitro sobre los parámetros de fecundación y desarrollo embrionario, utilizando distintos ratios espermatozoides:ovocito

En esta experiencia, cuyo diseño se representa en la figura 4, se estudió la penetrabilidad y capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos rodeados por las células del cúmulus (COC), cuando éstos fueron fecundados con diferentes ratios espermatozoides:ovocito (2.000:1, 3.000:1, 4.000:1, 6.000:1 y 8.000:1). Como grupo control se utilizaron ovocitos desnudos e inseminados con 2.000 espermatozoides por ovocito. En todos los grupos, las condiciones de cocultivo fueron las siguientes: volumen de medio de fecundación: 0'1 ml; número de ovocitos por microgota: 30; duración del cocultivo: 6 horas. En esta experiencia se utilizaron espermatozoides congelados y descongelados por el método B. Todas las muestras seminales procedieron del mismo eyaculado.

3.3.4. Experiencia 4: Influencia del tiempo de contacto espermatozoides - ovocitos sobre los parámetros de fecundación y desarrollo embrionario

En la figura 5 se puede observar el diseño experimental empleado para la realización de esta experiencia. Para evaluar el efecto del tiempo de contacto espermatozoides – ovocitos sobre los parámetros de fecundación y el desarrollo embrionario se utilizaron cuatro tiempos de cocultivo durante la FIV: 10 minutos, 30 minutos, 60 minutos y 6 horas, constituyendo este último grupo, el grupo control. En esta experiencia se emplearon grupos de 30 ovocitos desnudos en 0'1 ml de medio de fecundación y un número de 2.000 espermatozoides por ovocito.

Los espermatozoides utilizados en esta experiencia fueron congelados y descongelados siguiendo el método B. Se utilizaron muestras seminales procedentes del mismo eyaculado, pero éste fue diferente al utilizado en la experiencia anterior, aunque procedía del mismo verraco.

3.4. Análisis estadístico

Las experiencias 1, 2, 3 y 4 se han realizado en 3, 4, 5 y 5 replicados, respectivamente. El número de ovocitos en cada grupo y en cada replicado fue superior a 30.

Los resultados en cada experiencia se expresan como medias \pm SEM. Los parámetros de fecundación (penetración, monospermia, número de espermatozoides por ovocito penetrado y rendimiento) y de desarrollo embrionario (división embrionaria a las 48 horas de cultivo y desarrollo hasta blastocisto a las 144-168 horas de cultivo) fueron analizados por un ANOVA de dos vías (experiencias 1 y 2) o de una vía (experiencias 3 y 4), utilizando el paquete estadístico del SPSS 8.0. Cuando el ANOVA reveló un efecto significativo, los valores fueron comparados por el test de Tukey. Se ha considerado la existencia de diferencias significativas cuando el valor de P fue menor de 0'05.

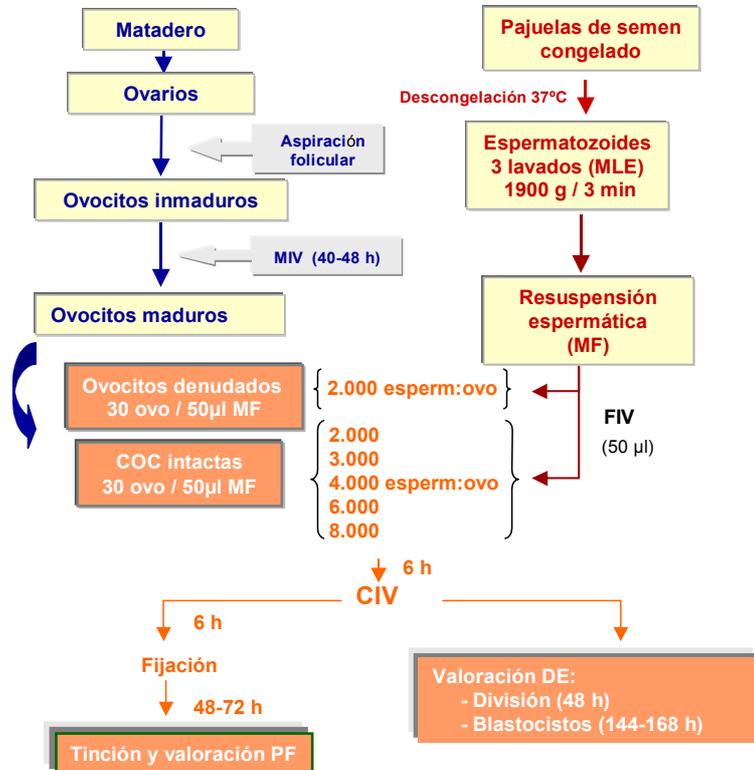


Figura 4. Representación esquemática del diseño experimental seguido en la experiencia 3.

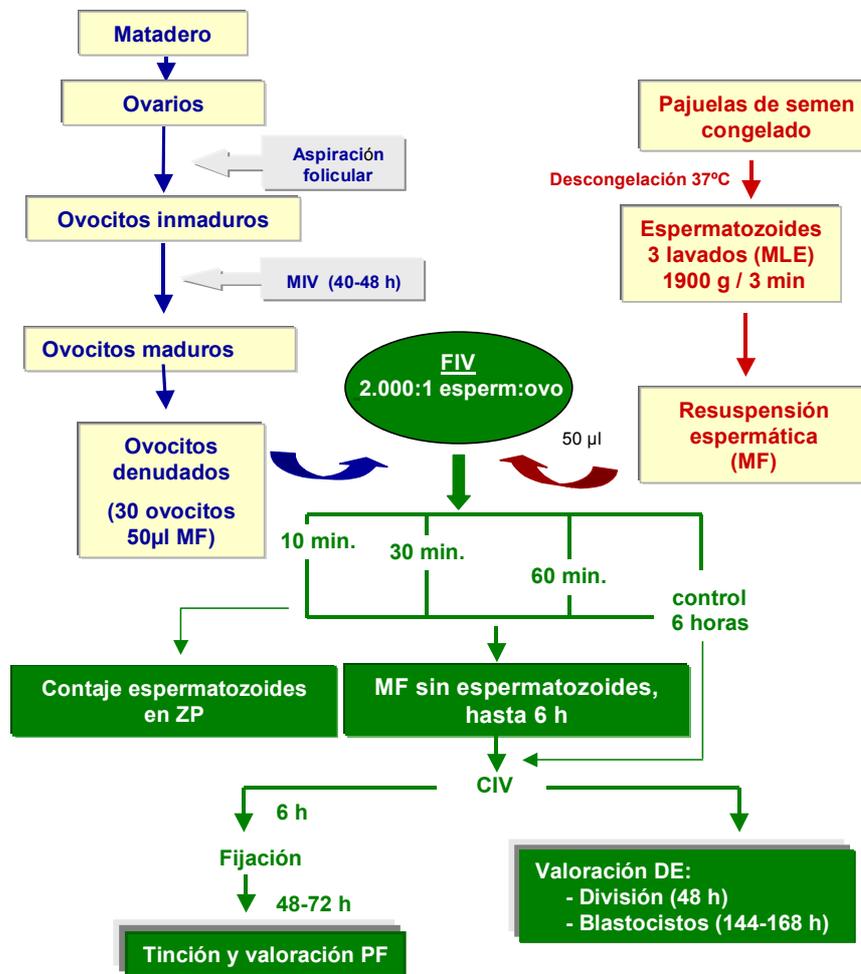


Figura 5. Representación esquemática del diseño experimental seguido en la experiencia 4.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Experiencia 1: Efecto del volumen de cocultivo y del número de ovocitos durante el cocultivo sobre los parámetros de fecundación, utilizando una concentración constante de espermatozoides

En este experimento se utilizaron 987 ovocitos madurados in vitro, en un total de 3 replicados. Los resultados se indican en la tabla 20 y en las figuras 6-10.

Tabla 20: Influencia del volumen de medio de cocultivo y del número de ovocitos durante el mismo sobre los parámetros de fecundación obtenidos tras la fecundación in vitro con 6×10^5 espermatozoides/ml*.

VM (ml)	NOOC (n°)	TOTAL (n°)	PEN (%)	MONOSP (%)	EO (n°)	RENDIM (%)
2	50	128	97'25 ± 1'79	5'70 ± 1'90	6'42 ± 1'24	5'51 ± 1'78
2	30	82	92'76 ± 1'98	3'95 ± 0'05	7'13 ± 0'19	3'66 ± 0'09
2	15	88	99'14 ± 0'86	3'51 ± 3'51	5'77 ± 1'42	3'51 ± 3'51
1	50	139	95'81 ± 1'91	10'72 ± 1'44	4'29 ± 0'22	10'27 ± 1'39
1	30	84	96'66 ± 1'92	6'06 ± 0'95	4'97 ± 0'14	5'83 ± 0'83
1	15	120	95'21 ± 2'41	2'23 ± 1'12	5'97 ± 0'51	2'15 ± 1'07
0'1	50	145	64'97 ± 3'66	68'23 ± 2'11	1'36 ± 0'05	44'23 ± 1'82
0'1	30	111	79'28 ± 2'57	63'13 ± 3'99	1'55 ± 0'14	49'87 ± 1'81
0'1	15	90	87'77 ± 2'94	26'73 ± 2'77	2'19 ± 0'07	23'33 ± 1'92
Probabilidad						
VM			0'001	0'001	0'001	0'001
NOOC			0'002	0'001	0'483	0'001
V x NOOC			0'001	0'001	0'356	0'001

* Los resultados son medias ± SEM a partir de 3 replicados.

VM: Volumen de medio de cocultivo; NOOC: N° de ovocitos por placa de cocultivo; PEN: Porcentaje de ovocitos penetrados; MONOSP: Porcentaje de ovocitos monospérmicos sobre el número de ovocitos penetrados; EO: N° medio de espermatozoides por ovocito penetrado; RENDIM: Porcentaje de ovocitos penetrados monospérmicamente sobre el total de ovocitos utilizados.

El análisis de varianza reveló un efecto significativo del volumen de medio ($P < 0.001$), del número de ovocitos ($P < 0.002$) y de la interacción de ambos factores ($P < 0.001$) sobre los porcentajes de penetración. Dichos porcentajes oscilaron, en los diferentes grupos, entre $64.97 \pm 3.66\%$ y $99.14 \pm 0.86\%$, encontrándose los valores más bajos en el grupo de 0.1 ml (Figura 6). Con volúmenes mayores, los porcentajes de penetración superaron en todos los casos el 90% y no fueron significativamente diferentes entre los distintos grupos de estudio.

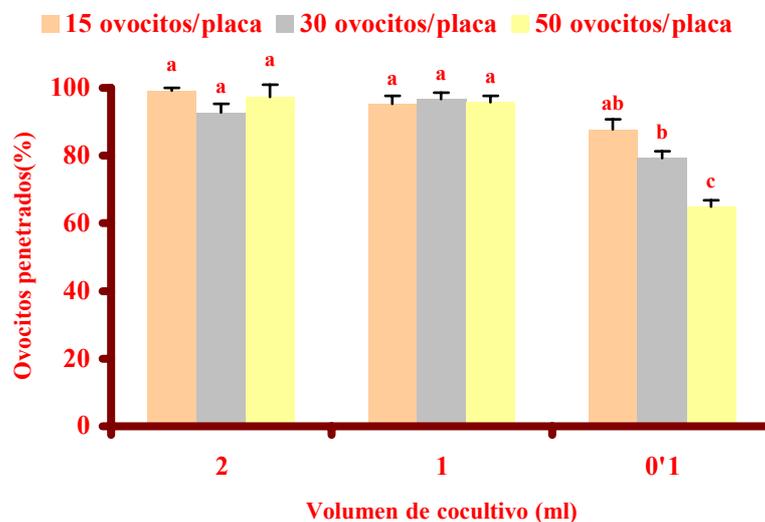


Figura 6: Efecto del volumen de medio y del número de ovocitos por placa de cultivo sobre el porcentaje de ovocitos penetrados, tras la fecundación in vitro con 6×10^5 espermatozoides/ml.^{a,b,c} indican diferencias significativas ($p < 0.01$, al menos).

Los porcentajes de ovocitos penetrados monospermicamente se vieron influenciados, como en el caso anterior, por el volumen de medio, el número de ovocitos y su interacción ($P < 0.001$). Los mejores resultados de monospermia se obtuvieron en el grupo de bajo volumen (0.1 ml) y elevado número de ovocitos (30-50), situándose en $63.13 \pm 3.99\%$ y $68.23 \pm 2.11\%$, respectivamente. Estos resultados fueron extraordinariamente elevados si se comparan con los obtenidos en los grupos restantes, donde las tasas de monospermia oscilaron entre $2.23 \pm 1.12\%$ y $26.73 \pm 2.77\%$ (Figura 7). El número medio de espermatozoides por ovocito penetrado siguió una tendencia similar a la de los porcentajes de penetración, viéndose influido por el volumen de medio

($P < 0.001$), pero no por el número de ovocitos presente durante el cocultivo ni por la interacción volumen de medio x número de ovocitos ($P > 0.35$). Se observó un elevado número de espermatozoides penetrantes cuando se utilizaron volúmenes de 1 y 2 ml (4.97 ± 0.14 - 7.13 ± 0.19) en comparación al obtenido con volúmenes de 0.1 ml (1.36 ± 0.05 - 2.19 ± 0.07) (Figura 8).

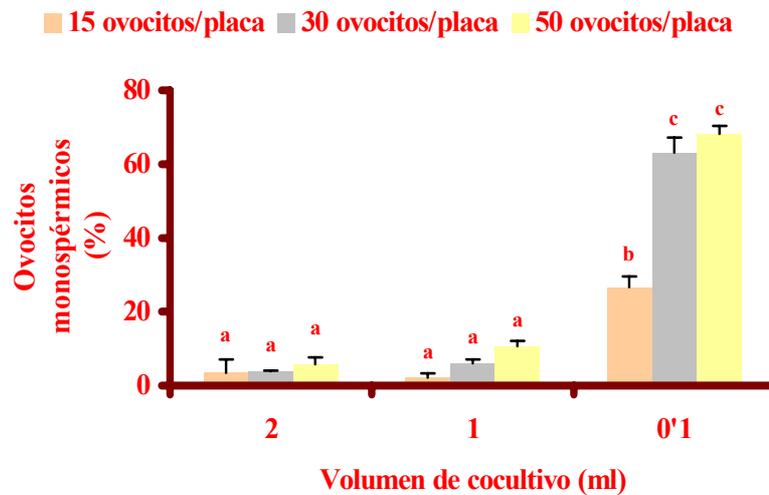


Figura 7: Efecto del volumen de medio y del número de ovocitos por placa de cocultivo sobre el porcentaje de ovocitos penetrados monospermicamente, tras la fecundación in vitro con 6×10^5 espermatozoides/ml. ^{a,b,c} indican diferencias significativas ($p < 0.003$, al menos).

El rendimiento total de los diferentes tratamientos se indica en la figura 9. El porcentaje de ovocitos monospermicos en relación al número total de ovocitos utilizados se vio influenciado por el volumen, el número de ovocitos y la interacción correspondiente ($P < 0.001$). Los mejores resultados se consiguieron con volúmenes de 0.1 ml y 30–50 ovocitos durante el cocultivo ($49.87 \pm 1.81\%$ - $44.23 \pm 1.82\%$, respectivamente), siendo significativamente superiores ($P < 0.002$) a los resultados obtenidos en los grupos restantes.

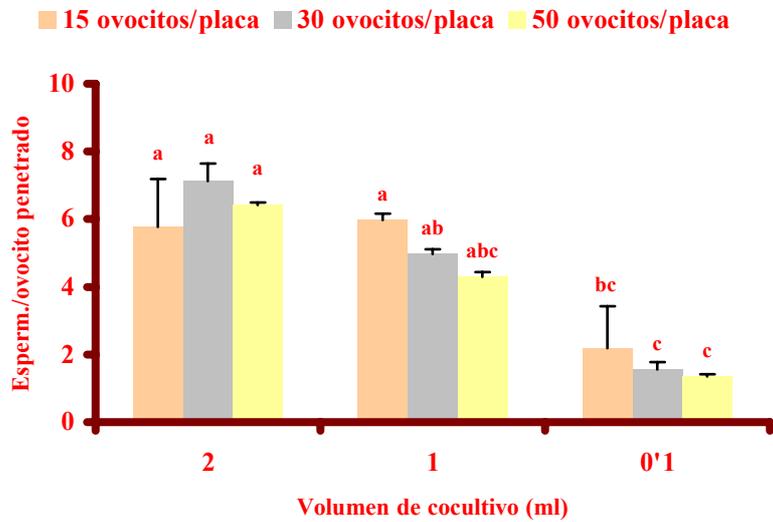


Figura 8: Efecto del volumen de medio y del número de ovocitos por placa de cocultivo sobre el número medio de espermatozoides por ovocito penetrado, tras la fecundación in vitro con 6×10^5 espermatozoides/ml. ^{a,b,c} indican diferencias significativas ($p < 0.04$, al menos).

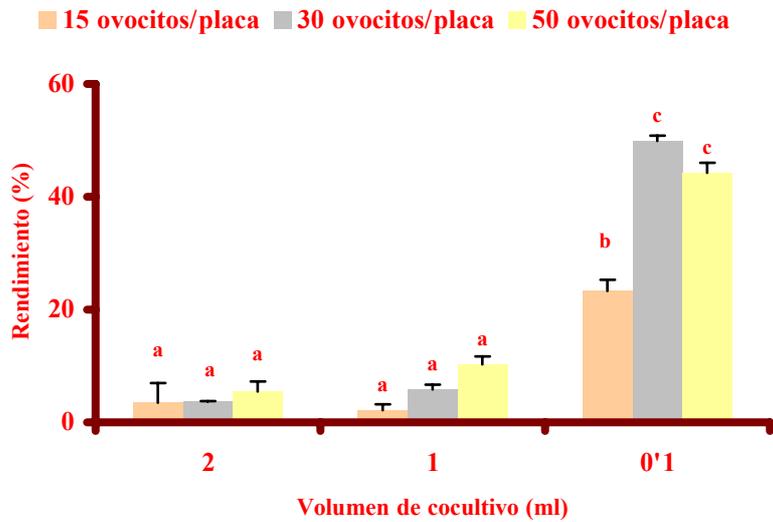


Figura 9: Efecto del volumen de medio y número de ovocitos por placa de cocultivo sobre el rendimiento total de los diferentes tratamientos, tras la fecundación in vitro con 6×10^5 espermatozoides/ml. ^{a,b,c} indican diferencias significativas ($p < 0.002$, al menos).

Por tanto, cuando se utiliza una concentración de espermatozoides constante (6×10^5 espermatozoides/ml), un bajo volumen (0'1 ml) y un número de ovocitos durante el cocultivo de 30 a 50 es la mejor combinación posible entre las analizadas, ya que se obtienen unos resultados aceptables de penetración (65%-80%) con elevados índices de monospermia (65%) y un rendimiento final cercano al 50%. Sin embargo, el utilizar una concentración espermática constante en diferentes volúmenes de medio y con diferente número de ovocitos altera ostensiblemente el ratio espermatozoides/ovocito.

Los ratios espermatozoides/ovocitos utilizados en esta experiencia (Figura 10) oscilaron entre 1.200:1 (grupo de 0'1 ml y 50 ovocitos) hasta 80.000:1 (grupo de 2 ml y 15 ovocitos).

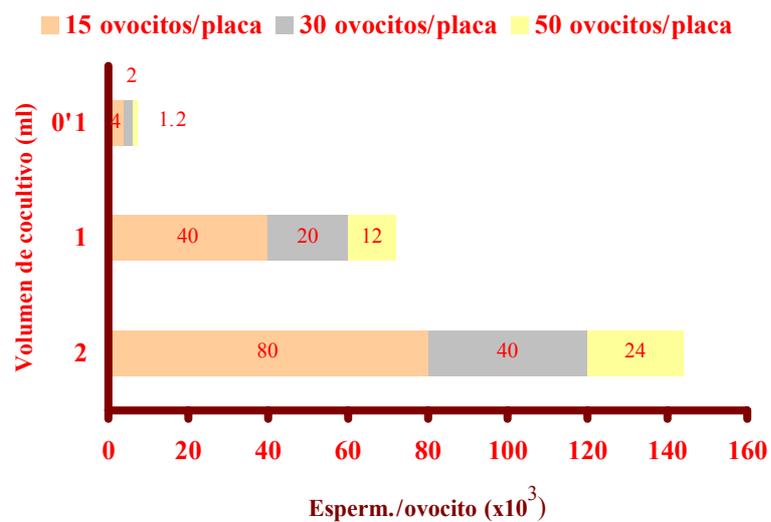


Figura 10: Ratios espermatozoides:ovocito utilizados en los diferentes tratamientos al emplear una concentración de 6×10^5 espermatozoides/ml durante el cocultivo.

4.2. Experiencia 2: Efecto del volumen de cocultivo y del número de ovocitos durante el cocultivo sobre los parámetros de fecundación y desarrollo embrionario, utilizando un ratio espermatozoides:ovocito de 2.000:1

Los resultados de esta experiencia se resumen en las tablas 21-22 y en las figuras 11-14. Se utilizaron un total de 2.732 ovocitos, distribuidos en 4 replicados, de los cuales 1.367 fueron fijados y teñidos para evaluar los PF y 1.365 siguieron en cultivo para evaluar el DE.

Tabla 21: Influencia del volumen de medio de cocultivo y del número de ovocitos durante el mismo sobre los parámetros de fecundación obtenidos tras la fecundación in vitro con 2.000 sperm/ovocito.*

VM (ml)	NOOC (n°)	TOTAL (n°)	PEN (%)	MONOSP (%)	EO (n°)	RENDIM (%)
2	50	142	71'31 ± 2'81	50'12 ± 2'80	1'72 ± 0'07	35'89 ± 3'09
2	30	145	63'47 ± 2'89	57'90 ± 5'80	1'66 ± 0'11	36'32 ± 2'39
2	15	155	60'27 ± 2'86	64'05 ± 5'79	1'47 ± 0'07	38'47 ± 3'25
1	50	135	75'90 ± 2'50	58'79 ± 4'39	1'63 ± 0'09	44'31 ± 1'99
1	30	147	65'26 ± 3'92	60'46 ± 5'01	1'56 ± 0'05	39'91 ± 5'34
1	15	180	65'06 ± 4'29	72'19 ± 5'08	1'36 ± 0'07	47'24 ± 5'72
0'1	50	159	81'79 ± 3'31	58'23 ± 4'78	1'61 ± 0'14	47'87 ± 4'97
0'1	30	171	71'26 ± 5'23	65'54 ± 3'47	1'48 ± 0'09	46'49 ± 3'32
0'1	15	140	69'47 ± 3'30	63'72 ± 8'79	1'49 ± 0'12	43'45 ± 3'96
Probabilidad						
VM			0'014	0'311	0'363	0'025
NOOC			0'001	0'060	0'034	0'781
V x NOOC			0'990	0'759	0'822	0'717

* Los resultados son medias ± SEM a partir de 4 replicados.

VMm: Volumen de medio de cocultivo; NOOC: N° de ovocitos por placa de cocultivo; PEN: Porcentaje de ovocitos penetrados; MONOSP: Porcentaje de ovocitos monospérmicos sobre el número de ovocitos penetrados; EO: N° medio de espermatozoides por ovocito penetrado; RENDIM: Porcentaje de ovocitos penetrados monospérmicamente sobre el total de ovocitos utilizados.

Ni en los parámetros de fecundación ni en los desarrollo embrionario existió una interacción significativa entre el volumen de medio y el número de ovocitos en el cocultivo. Sin embargo, el efecto individual de cada factor dependió del parámetro analizado (Tablas 21 y 22).

Tabla 22.- Influencia del volumen de medio de cocultivo y del número de ovocitos durante el mismo sobre los porcentajes de división embrionaria y de desarrollo hasta blastocisto, utilizando 2.000 espermatozoides/ovocito durante la fecundación in vitro*.

VM (ml)	NOOC (n°)	TOTAL (n°)	DIV (%)	BLASTO (%)
2	50	186	64'27 ± 3'13	18'89 ± 2'03
2	30	151	73'10 ± 4'05	26'45 ± 3'60
2	15	118	66'36 ± 3'68	14'32 ± 2'83
1	50	180	69'83 ± 2'31	22'33 ± 0'88
1	30	119	69'77 ± 2'26	26'18 ± 5'47
1	15	118	63'51 ± 3'55	21'19 ± 0'79
0'1	50	155	75'66 ± 6'39	32'50 ± 7'13
0'1	30	149	71'97 ± 1'17	31'78 ± 3'13
0'1	15	189	75'74 ± 1'00	23'85 ± 1'42
Probabilidad				
<i>VM</i>			0'036	0'012
<i>NOOC</i>			0'553	0'031
<i>V x NOOC</i>			0'274	0'696

* Los resultados son medias ± SEM a partir de 4 replicados.

VM: Volumen de medio de cocultivo; NOOC: N° de ovocitos por placa de cocultivo; DIV: porcentaje de embriones divididos a las 48 horas de la fecundación in vitro; BLASTO: porcentaje de blastocistos a las 144 horas de la fecundación in vitro.

Las tasas de penetración variaron significativamente ($P < 0'014$) según el volumen de medio utilizado (Tabla 21). Como se puede observar en la figura 11, los porcentajes de penetración aumentaron a medida que se disminuyó el volumen de medio de cocultivo (65'02 ± 2'04%, 68'74 ± 2'44% y 74'17 ± 2'68% para volúmenes de 2 ml, 1 ml y 0'1 ml, respectivamente). Sin embargo, el volumen de medio de cocultivo utilizado no influyó

sobre los porcentajes de monospermia ni sobre el número medio de espermatozoides por ovocito ($P=0'311$ y $P=0'363$, respectivamente).

Los porcentajes de ovocitos monospermicos se situaron entre $57'36\pm 3'13$ y $63'81\pm 3'10$, mientras que el número medio de espermatozoides por ovocito penetrado se mantuvo alrededor de 1'5, independientemente del volumen de medio utilizado (Figura 11). Por tanto, el rendimiento final se vio influenciado exclusivamente por las tasas de penetración alcanzadas con los diferentes volúmenes utilizados. Dicho rendimiento fue aproximadamente 10 puntos más elevado ($P<0'01$) con volúmenes de 0'1 ml ($45'94\pm 2'23$) que con volúmenes de 2 ml ($36'90\pm 1'57$) (Figura 11).

El número de ovocitos durante el cocultivo influyó significativamente sobre las tasas de penetración ($P<0'001$), y sobre el número medio de espermatozoides por ovocito ($P<0'034$), pero no sobre los porcentajes de monospermia ($P=0'060$) ni sobre el rendimiento final ($P=0'781$). Cuando se utiliza un número elevado de ovocitos durante el cocultivo (50) se obtiene un porcentaje de penetración superior ($P<0'01$) al alcanzado con 30 ó 15 ovocitos ($76'33\pm 1'99\%$, $66'66\pm 2'38\%$ y $64'93\pm 2'18\%$, para 50, 30 y 15 ovocitos, respectivamente) (Figura 12). El número medio de espermatozoides por ovocito penetrado, como en el caso anterior, se situó en torno a 1'5, existiendo diferencias significativas ($P<0'02$) entre los grupos extremos (Figura 12). Como sucede con los diferentes volúmenes utilizados, los porcentajes de monospermia no variaron significativamente según el número de ovocitos utilizados, aunque si existió una tendencia referente a un aumento de dicho parámetro a medida que el número de ovocitos por placa de cocultivo disminuyó ($55'71\pm 2'44\%$, $61'30\pm 2'71\%$ y $66'65\pm 3'72\%$, para 50, 30 y 15 ovocitos por placa; Figura 12). Esta tendencia motiva la no existencia de diferencias significativas en el rendimiento final de los diferentes tratamientos, anulando las diferencias existentes en las tasas de penetración entre los diferentes grupos estudiados. El rendimiento final osciló entre el $40'91\pm 2'39\%$ y el $43'05\pm 2'56\%$ (Figura 12).

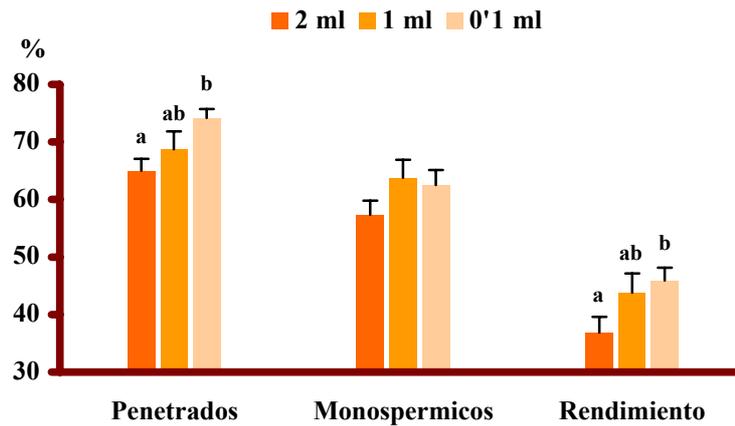


Figura 11.- Influencia del volumen de medio durante el cocultivo sobre los porcentajes de penetración, monospermia y rendimiento final de los sistemas, utilizando 2.000 espermatozoides/ovocito. Columnas con diferentes letras dentro de cada variable difieren significativamente ($P < 0.03$).

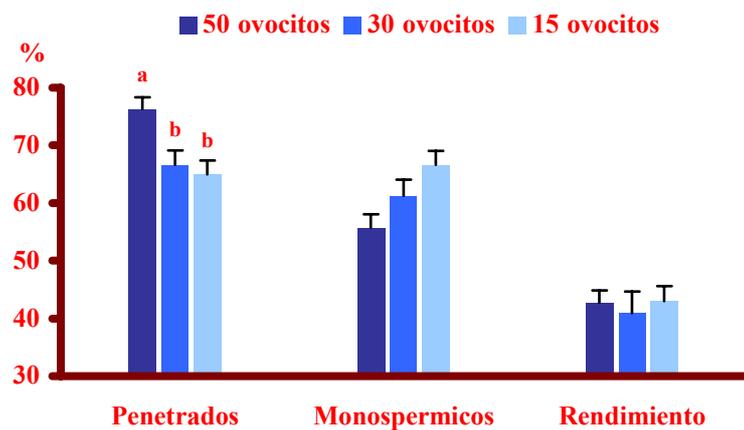


Figura 12.- Influencia del número de ovocitos durante el cocultivo sobre los porcentajes de penetración, monospermia y rendimiento final de los sistemas, utilizando 2.000 espermatozoides/ovocito. Columnas con diferentes letras dentro de cada variable difieren significativamente ($P < 0.01$, al menos).

Los porcentajes de división embrionaria y los de desarrollo hasta el estadio de blastocisto se vieron influenciados por el volumen de medio de cocultivo ($P < 0.036$ y $P < 0.012$, respectivamente; tabla 22), oscilando entre $67.70 \pm 1.70\%$ - $74.46 \pm 2.05\%$ y $19.89 \pm 2.13\%$ - $29.38 \pm 2.66\%$, respectivamente, en los diferentes grupos estudiados (Tabla 22). La división embrionaria fue superior ($P < 0.05$) cuando se utilizaron volúmenes de 0.1 ml ($67.91 \pm 2.21\%$, $67.70 \pm 1.70\%$ y $74.46 \pm 2.05\%$ para volúmenes de 2ml, 1ml y 0.1 ml, respectivamente; figura 13). Algo similar ocurrió con el porcentaje de embriones que se desarrollaron hasta el estadio de blastocisto, aunque en este caso no existieron diferencias significativas entre los valores alcanzados con 1ml y 0.1 ml (Figura 13). No obstante, con volúmenes de 0.1 ml se observa una tendencia superior en el porcentaje de blastocistos obtenido que con volúmenes de 1 ml ($29.38 \pm 2.66\%$ & $23.23 \pm 1.81\%$).

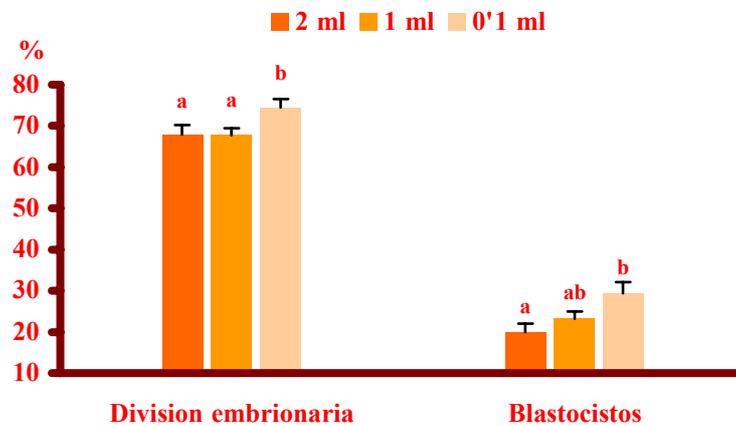


Figura 13.- Influencia del volumen de medio durante el cocultivo sobre los porcentajes de división embrionaria y de desarrollo hasta blastocisto, utilizando 2.000 espermatozoides/ovocito durante la fecundación in vitro. Columnas con diferentes letras dentro de cada variable difieren significativamente ($P < 0.04$, al menos).

El número de ovocitos utilizados durante el cocultivo no afectó a la división embrionaria ($P=0'553$), pero sí influyó sobre el número final de blastocistos ($P<0'031$) (Tabla 22), obteniéndose resultados superiores con 30 ovocitos por placa ($24'57\pm 2'85\%$, $28'14\pm 2'32\%$ y $19'79\pm 1'56\%$, para 50, 30 y 15 ovocitos/placa, respectivamente; figura 14).

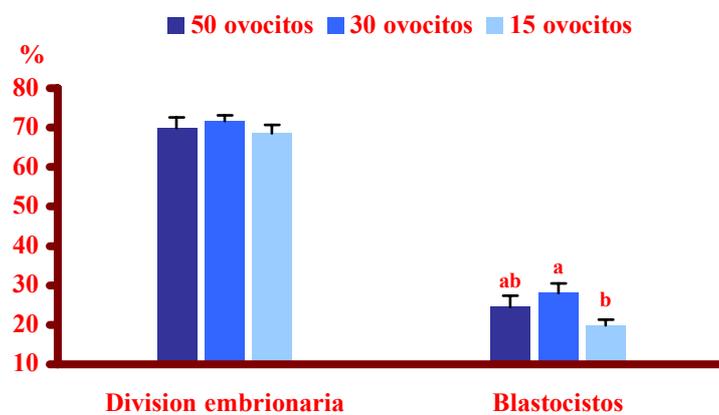


Figura 14.- Influencia del número de ovocitos durante el cocultivo sobre los porcentajes de división embrionaria y de desarrollo hasta blastocisto, utilizando 2.000 espermatozoides/ovocito durante la fecundación in vitro. Columnas con diferentes letras dentro de cada variable difieren significativamente ($P<0'04$).

4.3. Experiencia 3: Efecto de la presencia de células del cúmulus durante la fecundación in vitro sobre los parámetros de fecundación y desarrollo embrionario, utilizando distintos ratios espermatozoides:ovocitos

Se utilizaron un total de 2.546 ovocitos, en 5 replicados, de los cuales 1.196 fueron fijados y teñidos para analizar los PF y 1.350 siguieron el cultivo para estudiar el DE. Los resultados se sumarizan en las tablas 23 y 24, y en las figuras 15 y 16.

Como se puede observar en la tabla 23, la penetrabilidad de los ovocitos aumentó ($P < 0.05$) a medida que se incrementó el ratio espermatozoides:ovocito, alcanzándose los valores más elevados con el ratio 8.000:1 ($72.14 \pm 6.48\%$). Estos valores fueron similares a los obtenidos utilizando ovocitos desnudos y 2.000 espermatozoides:ovocito (grupo control). Como era de esperar, los porcentajes de monospermia siguieron un perfil inverso a los de penetración; dichos porcentajes disminuyeron a medida que se aumentó la proporción espermatozoides:ovocito. Se obtuvieron elevados índices de monospermia en los tres ratios más bajos ($82.59\% - 94.85\%$), donde los porcentajes de penetración fueron próximos tan sólo al 30%. La monospermia disminuyó drásticamente ($P < 0.05$) en el grupo de 8.000 espermatozoides:ovocito, situándose en torno al 35%. En el grupo control se obtuvo una monospermia del 60%, similar a la alcanzada con 6.000 espermatozoides:ovocito.

Tabla 23. Efecto del número de espermatozoides por ovocito durante la fecundación in vitro de ovocitos rodeados por las células del cúmulus sobre los parámetros de fecundación.*

TRATAMIENTO Esperm/ovocito**	TOTAL (n°)	PEN (%)	MONOSP (%)	EO (n°)	RENDIM (%)
2.000	195	29.95 ± 3.71^a	88.72 ± 5.43^a	1.11 ± 0.05^{ab}	25.86 ± 1.62^d
3.000	188	31.18 ± 2.66^a	94.85 ± 3.37^a	1.07 ± 0.04^a	21.80 ± 1.81^d
4.000	190	33.43 ± 3.79^{ab}	82.59 ± 5.11^a	1.17 ± 0.05^{ab}	27.25 ± 2.95^d
6.000	203	50.94 ± 4.78^b	56.75 ± 5.38^b	1.50 ± 0.07^b	28.65 ± 2.77^d
8.000	195	72.14 ± 6.48^c	35.85 ± 5.59^c	2.11 ± 0.18^c	24.50 ± 1.62^d
Control	225	73.51 ± 3.48^c	59.51 ± 1.99^b	1.45 ± 0.03^{ab}	43.65 ± 2.03^e

* Los resultados son medias \pm SEM a partir de 5 replicados. ** Como control se utilizaron ovocitos desnudos y 2.000 espermatozoides/ovocito durante la fecundación in vitro. PEN: Porcentaje de ovocitos penetrados; MONOSP: Porcentaje de ovocitos monospermicos sobre el número de ovocitos penetrados; EO: N° medio de espermatozoides por ovocito penetrado; RENDIM: Porcentaje de ovocitos penetrados monospermicamente sobre el total de ovocitos utilizados. Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas: ^{a,b,c} $P < 0.05$, al menos; ^{d,e} $P < 0.007$, al menos.

El número de espermatozoides por ovocito penetrado osciló entre $1'07 \pm 0'04$ y $2'11 \pm 0'18$, alcanzándose los valores más elevados ($P < 0'05$) en el grupo de mayor número de espermatozoides por ovocito. En cualquier caso, al analizar el rendimiento final de cada sistema, se puede observar que no existieron diferencias significativas entre los distintos tratamientos, cuando se utilizaron ovocitos rodeados de células del cúmulus, estando los valores comprendidos entre el 20% y el 30%. Estos resultados fueron significativamente inferiores ($P < 0'007$) a los obtenidos en ausencia de células del cúmulus y con un ratio espermatozoides:ovocito de 2.000:1 (Figura 15), donde se obtuvo un rendimiento cercano al 45%.

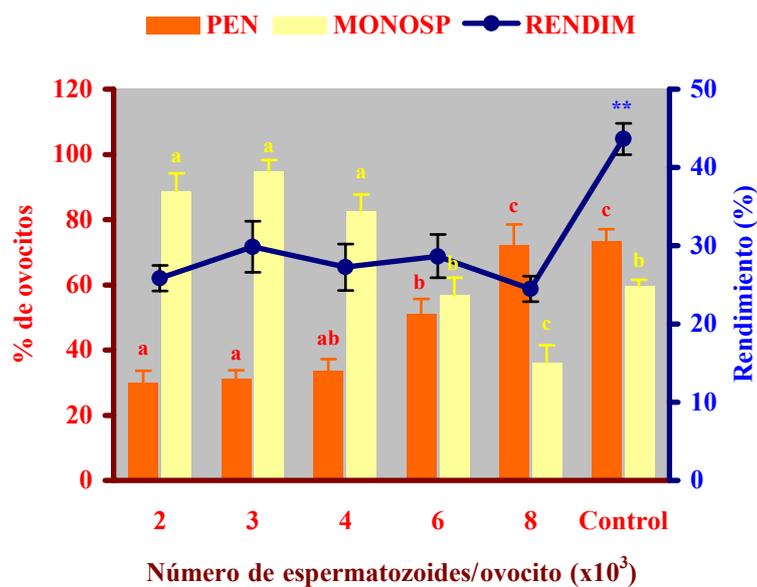


Figura 15.- Rendimiento alcanzado al inseminar *in vitro* ovocitos rodeados por sus células del cúmulus con 2.000 – 8.000 espermatozoides:ovocito. En el grupo control se fecundaron ovocitos desnudos con 2.000 espermatozoides:ovocito. Los resultados son medias \pm SEM obtenidas a partir de 5 replicados. El número de ovocitos osciló entre 188 y 225 en los diferentes grupos. PEN: Porcentaje de ovocitos penetrados; MONOSP: Porcentaje de ovocitos monospermáticos sobre el número de ovocitos penetrados; EO: N° medio de espermatozoides por ovocito penetrado; RENDIM: Porcentaje de ovocitos penetrados monospermicamente sobre el total de ovocitos utilizados. Diferentes superíndices para un mismo parámetro indican diferencias significativas: ^{a,b,c} $P < 0'05$, al menos. ^{**} $P < 0'07$ (al menos) con respecto a los demás grupos.

Como se aprecia en la tabla 24, los porcentajes de división embrionaria fueron inferiores ($P < 0'05$) cuando los ovocitos rodeados por sus células del cúmulus fueron

inseminados con 2.000, 3.000 y 4.000 espermatozoides/ovocito, obteniéndose unos valores entre el 20 y el 30%. Cuando se utilizó un número superior de espermatozoides/ovocito (6.000 y 8.000), estos porcentajes aumentaron, por encima de 20 puntos, situándose en, aproximadamente, el 50%, porcentaje que asimismo fue inferior, aunque no significativamente, al obtenido en el grupo control (58'46%).

Las amplias diferencias observadas en los porcentajes de división embrionaria entre los 3 primeros y los tres últimos grupos no se vieron reflejadas en el porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto (Tabla 24, Figura 16). Nuevamente, el grupo control fue el que alcanzó resultados superiores, aunque no significativamente diferentes de los grupos de 6.000 y 8.000 espermatozoides/ovocito.

Tabla 24. Efecto del número de espermatozoides por ovocito durante la fecundación in vitro de ovocitos rodeados por las células del cúmulus sobre los parámetros de desarrollo embrionario.*

TRATAMIENTO	TOTAL	DIVISIÓN	BLASTOCISTOS
Esperm/ovocito	(n°)	(%)	(%)
2.000	223	30'93 ± 5'21 ^a	6'04 ± 2'21 ^a
3.000	188	21'79 ± 1'82 ^a	11'52 ± 2'22 ^{ab}
4.000	190	30'77 ± 3'31 ^a	13'68 ± 1'56 ^{ab}
6.000	185	47'34 ± 5'86 ^b	19'49 ± 3'57 ^{bc}
8.000	191	50'00 ± 5'73 ^b	17'30 ± 1'09 ^{bc}
Control	373	58'46 ± 2'21 ^b	23'21 ± 1'66 ^c

* Los resultados son medias±SEM a partir de 5 replicados. ** Como control se utilizaron ovocitos desnudos y 2.000 espermatozoides/ovocito durante la fecundación in vitro. ; DIVISIÓN: porcentaje de embriones divididos a las 48 horas de la fecundación in vitro; BLASTOCISTOS: porcentaje de blastocistos a las 144 horas de la fecundación in vitro. Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas: ^{a,b,c} P<0'05, al menos.

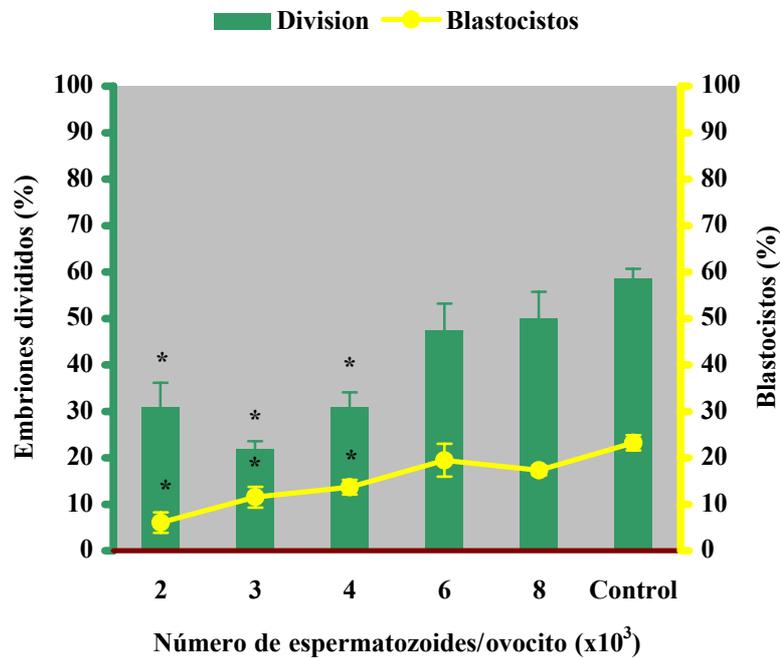


Figura 16.- Resultados del desarrollo embrionario alcanzados al inseminar *in vitro* ovocitos rodeados por sus células del cúmulus con 2.000–8.000 espermatozoides:ovocito. En el grupo control se fecundaron ovocitos desnudos con 2.000 espermatozoides:ovocito. Los resultados son medias \pm SEM obtenidas a partir de 5 replicados. El número de ovocitos utilizado fue 223, 188, 190, 185, 191 y 373 para los grupos de 2, 3, 4, 6, 8 $\times 10^3$ espermatozoides/ovocito y control, respectivamente. Grupos con asterisco, dentro de un mismo parámetro, difieren significativamente del grupo control ($P < 0,05$, al menos).

4.4. Experiencia 4: Efecto del tiempo de contacto espermatozoides - ovocitos sobre los parámetros de fecundación y desarrollo embrionario.

Se utilizaron un total de 1.596 ovocitos, en 5 replicados, de los cuales 142 fueron fijados y teñidos para evaluar el número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida, 751 fueron fijados y teñidos para analizar los PF y 703 siguieron el cultivo para estudiar el DE. Los resultados de esta experiencia se indican en las tablas 25 y 26 y en las figuras 17, 18 y 19.

Como se observa en la tabla 25, las tasas de penetración fueron similares en los diferentes tiempos evaluados, oscilando entre el 61'27% y el 68'16%. Por el contrario, si existieron diferencias significativas ($P < 0'04$) en los resultados de monospermia. Sorprendentemente, el aumento del tiempo de contacto entre ambos gametos produjo mayores porcentajes de ovocitos penetrados por un único espermatozoide. Efectivamente, cuando espermatozoides y ovocitos se coincubaron durante tan sólo 10 ó 30 minutos, los porcentajes de monospermia fueron inferiores al 48%, elevándose dichos porcentajes hasta cerca del 65% e incluso por encima del 70% cuando el periodo de coincubación se incrementó a 60 minutos y 6 horas, respectivamente.

Tabla 25. Efecto del tiempo de contacto entre espermatozoides y ovocitos sobre los parámetros de fecundación*.

TIEMPO DE COCULTIVO	TOTAL (n°)	PEN (%)	MONOSP (%)	EO (n°)	RENDIM (%)
10 min	179	64'77 ± 5.05	40'84 ± 2'09 ^a	1'69 ± 0'03 ^a	26'63 ± 2'88 ^c
30 min	196	61'56 ± 5.50	47'16 ± 5'61 ^a	1'62 ± 0'09 ^a	29'02 ± 4'45 ^c
60 min	204	61'27 ± 7.18	63'89 ± 4'42 ^b	1'46 ± 0'03 ^{ab}	39'51 ± 6'20 ^{cd}
6 h (Control)	172	68'16 ± 3'18	72'31 ± 2'61 ^b	1'34 ± 0'05 ^b	49'32 ± 2'96 ^d

* Los resultados son medias ± SEM a partir de 5 replicados. La fecundación in vitro se efectuó utilizando ovocitos desnudados y un número de espermatozoides por ovocito de 2.000. PEN: Porcentaje de ovocitos penetrados; MONOSP: Porcentaje de ovocitos monospermicos sobre el número de ovocitos penetrados; EO: N° medio de espermatozoides por ovocito penetrado; RENDIM: Porcentaje de ovocitos penetrados monospermicamente sobre el total de ovocitos utilizados. Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas: ^{a,b} $P < 0'04$, al menos; ^{c,d} $P < 0'03$, al menos.

El número de espermatozoides por ovocito siguió una tendencia similar a la monospermia, obteniéndose los valores más bajos ($1'34 \pm 0'05$) en el grupo control (6 horas de cocultivo).

Por el contrario, como era de esperar, el número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida en cada grupo de ovocitos aumentó significativamente ($P < 0'02$, al menos) a partir de los 60 minutos de cocultivo, incrementándose de forma extraordinaria en el grupo de 6 horas de contacto ($P < 0'001$). El número medio de espermatozoides unidos a la zona pelúcida fue de $34'12 \pm 1'66$, $46'77 \pm 2'80$, $62'83 \pm 3'83$ y $139'51 \pm 6'13$, para los periodos de cocultivo de 10 minutos, 30 minutos, 60 minutos y 6 horas, respectivamente (Figura 17; Foto 7).

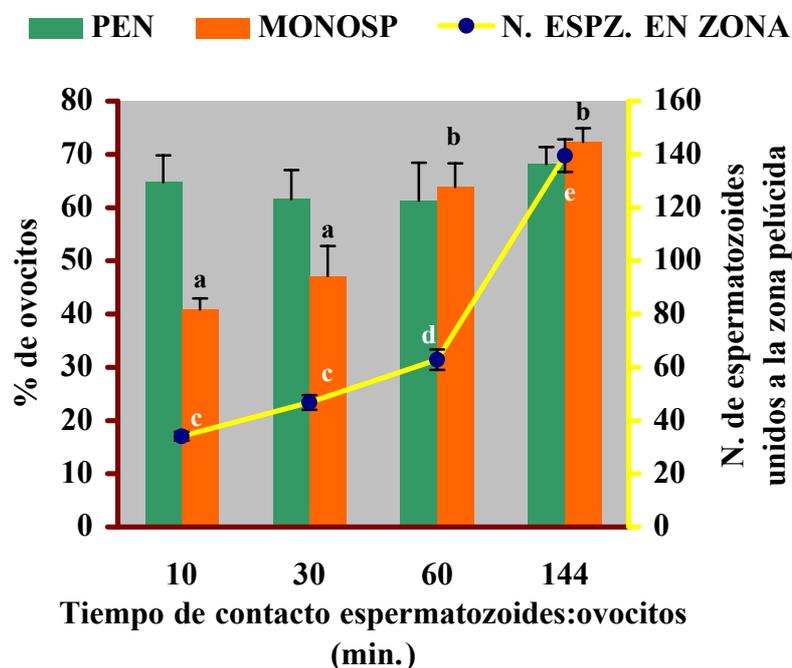


Figura 17.- Relación entre el tiempo de contacto de ambos gametos y el número medio de espermatozoides unidos a la zona pelúcida. En forma de barras se representan los porcentajes de penetración (PEN) y los de monospermia (MONOSP). La fecundación *in vitro* se efectuó utilizando ovocitos desnudos y un número de espermatozoides por ovocito de 2.000. A los 10 minutos, 30 minutos, 60 minutos y 6 horas de cocultivo, los espermatozoides unidos lábilmente a la zona pelúcida fueron eliminados mecánicamente mediante el paso repetido de los ovocitos a través de una pipeta adelgazada. Posteriormente, los ovocitos fueron lavados tres veces e incubados para determinar los parámetros de fecundación o de desarrollo embrionario. Los resultados son medias \pm SEM obtenidas a partir de 5 replicados. El número de ovocitos osciló entre 36 y 40 en los diferentes grupos. Diferentes letras dentro de un mismo parámetro indican diferencias significativas: ^{a,b} $P < 0'04$, al menos, ^{c,d} $P < 0'0001$, ^{c,e} $P < 0'001$.

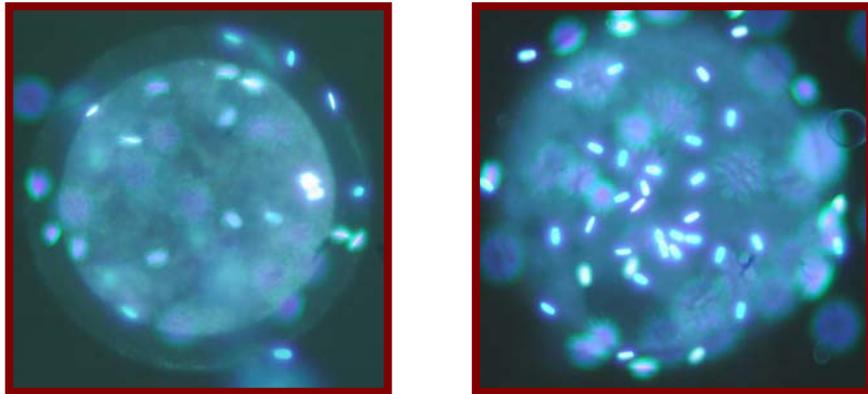


Foto 7. Ovocitos con diferente número de espermatozoides adheridos a la zona pelúcida tras la tinción con Hoechts 33342.

Ya que los porcentajes de penetración fueron similares entre los diferentes grupos, las diferencias observadas en los niveles de monospermia influyeron determinadamente en el rendimiento final de de cada uno de los sistemas. Así, como se puede observar en la figura 18, el rendimiento final en el grupo control estuvo próximo al 50%, porcentaje significativamente superior ($P < 0.03$) a los obtenidos en los grupos donde el periodo de cocultivo fue de 10 ó 30 minutos, donde el rendimiento final se situó entre el 25 y el 30%.

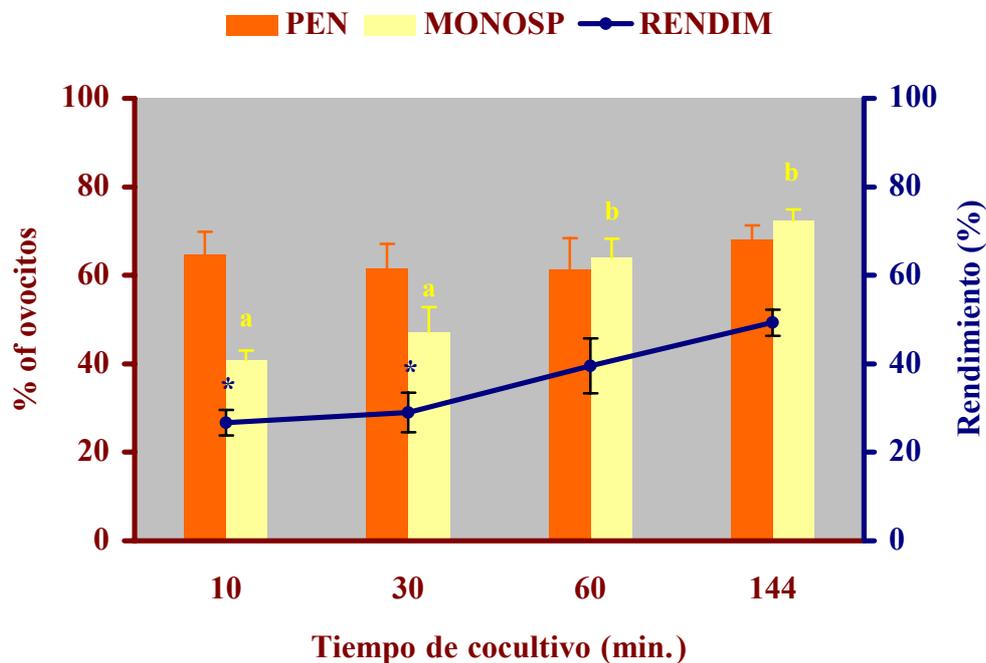


Figura 18.- Rendimiento alcanzado con diferentes tiempos de cocultivo espermatozoides-ovocitos. La fecundación *in vitro* se efectuó utilizando ovocitos desnudos y un número de espermatozoides por ovocito de 2.000. Los resultados son medias \pm SEM obtenidas a partir de 5 replicados. El número de ovocitos osciló entre 172 y 204 en los diferentes grupos. PEN: Porcentaje de ovocitos penetrados; MONOSP: Porcentaje de ovocitos monospermicos sobre el número de ovocitos penetrados; EO: N° medio de espermatozoides por ovocito penetrado; RENDIM: Porcentaje de ovocitos penetrados monospermicamente sobre el total de ovocitos utilizados. Diferentes superíndices para un mismo parámetro indican diferencias significativas: ^{a,b} $P < 0.04$, al menos. * $P < 0.03$ (al menos) respecto al grupo control.

Cuando el periodo de coincubación fue de 60 minutos, el rendimiento no fue significativamente diferente del resto de los grupos, aunque se situó 10 puntos por encima de los grupos de menor tiempo de coincubación y 10 puntos por debajo del grupo control (40%).

Pese a las diferencias observadas en el rendimiento final de cada grupo, no existieron diferencias significativas en los porcentajes de división embrionaria y en el desarrollo hasta el estadio de blastocisto. Los porcentajes de división embrionaria se situaron en torno al 40-50% y los de desarrollo hasta blastocisto entre el 17 y el 25% (Tabla 26; Figura 19).

Tabla 26. Efecto del tiempo de contacto entre espermatozoides y ovocitos sobre los parámetros de desarrollo embrionario*.

TIEMPO DE COCULTIVO	TOTAL (n°)	DIVISIÓN (%)	BLASTOCISTOS (%)
10 min	160	40'83 ± 4'90	21'50 ± 3'95
30 mini	168	44'67 ± 3'78	17'52 ± 1'72
60 min	170	47'51 ± 4'51	19'47 ± 1'70
6 h (Control)	20	50'43 ± 2'80	25'46 ± 2'29

Los resultados son medias±SEM a partir de 5 replicados. La fecundación in vitro se efectuó utilizando ovocitos desnudos y un número de espermatozoides por ovocito de 2000. DIVISIÓN: porcentaje de embriones divididos a las 48 horas de la fecundación in vitro; BLASTOCISTOS: porcentaje de blastocistos a las 144 horas de la fecundación in vitro.

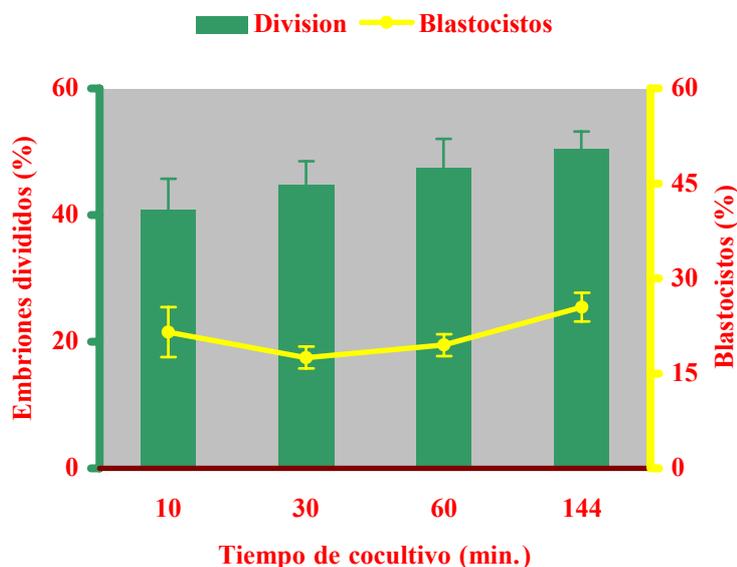


Figura 19.- Resultados del desarrollo embrionario alcanzado con diferentes tiempos de contacto entre espermatozoides y ovocitos. La fecundación in vitro se efectuó utilizando ovocitos desnudos y un número de espermatozoides por ovocito de 2.000. Los resultados son medias±SEM obtenidas a partir de 5 replicados. El número de ovocitos utilizado osciló entre 160 y 205 en los distintos grupos.

Discusión

5. DISCUSIÓN

En la actualidad, el principal obstáculo para obtener un aceptable número de embriones in vitro es la elevada incidencia de penetraciones polispermicas tras el cocultivo de ambos gametos. A pesar de lo mucho que se ha estudiado sobre la polispermia y de todos los trabajos realizados para poder reducirla, poco se conoce acerca de las condiciones que soportan los espermatozoides y los ovocitos durante el cocultivo, condiciones tales como el volumen del medio, el número de ovocitos, la relación espermatozoides/ovocito o las interacciones espermatozoides/ovocitos durante la FIV. Por tanto, es probable que variando dichas condiciones se puedan modificar los parámetros de fecundación y consecuentemente la capacidad de desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto.

5.1. Efecto del volumen de medio, del número de ovocitos y del número de espermatozoides durante el cocultivo

5.1.1. Con una concentración constante de espermatozoides/ml

En la primera experiencia de este trabajo, empleando una concentración constante de 6×10^5 espermatozoides/ml, con tres volúmenes de cocultivo (2, 1 y 0'1 ml) y tres números de ovocitos en cada volumen de cocultivo (50, 30 y 15), se desprende que con la utilización de un bajo volumen de medio (0'1 ml) y un elevado número de ovocitos durante el cocultivo (30-50) se obtienen rendimientos muy superiores (45-50%) que con el resto de las condiciones probadas (2-20%). Esta mayor eficacia es debida, sin duda, al elevado índice de ovocitos monospermicos obtenido con las condiciones mencionadas (60-70%), manteniendo, al mismo tiempo, unos niveles de penetración superiores al 65% (65-80%). La utilización de volúmenes superiores a 0'1 ml ofreció en todos los casos elevados índices de penetración (>90%), pero escasos porcentajes de monospermia (<11%). Sin embargo, estos resultados deben ser considerados con mucha cautela, ya que al utilizar una concentración constante de espermatozoides/ml en diferentes volúmenes de medio y con distinto número de ovocito, el número de espermatozoides expuestos a cada ovocito varía ampliamente entre los diferentes grupos. Así, en esta experiencia el ratio espermatozoides:ovocito varió entre 1.200 (volumen de 0'1 ml y 50 ovocitos por placa) y 80.000 (volumen de 2 ml y 15 ovocitos por placa). Se ha demostrado que en condiciones

in vivo se pueden provocar un número elevado de penetraciones polispermicas aumentando el número de espermatozoides en el reservorio espermático o en el lugar de la fecundación (Hunter, 1991). In vitro, se sabe que una de las causas principales de la polispermia es la elevada concentración de espermatozoides durante el cocultivo, debido, fundamentalmente, a que el número de espermatozoides que sufre una verdadera reacción acrosómica permanece constante (15-20%) durante las primeras horas de cocultivo (Vázquez y cols., 1993), por lo que los ovocitos están expuestos a varias oleadas de espermatozoides penetrantes en las condiciones de FIV actuales. Ésto posibilita que cuanto mayor sea el ratio espermatozoides:ovocito mayores son las posibilidades de que los ovocitos sean penetrados por más de un espermatozoide. Posiblemente, las interacciones volumen de medio x número de ovocitos observadas en esta experiencia sean debidas fundamentalmente a la variación del número de espermatozoides por ovocito más que a un efecto directo de dichos parámetros. Efectivamente, en esta experiencia se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de monospermia y en el rendimiento final al variar el número de ovocitos dentro de un mismo volumen de medio (0'1 ml). Efectivamente, al reducir el número de ovocitos desde 30-50 a 15, utilizando 0'1 ml de medio se incrementa el ratio espermatozoides:ovocito desde 1.200-2.000 a 4.000, lo cual provoca una disminución de las penetraciones monospermicas (27% & 63-68%) y un descenso del 50% del rendimiento final (23% & 45-50%).

De los resultados de esta primera experiencia se desprende que un ratio de 1.200:1 a 2.000:1 espermatozoides:ovocitos es el más adecuado para disminuir la polispermia cuando se utilizan volúmenes de 0'1 ml, aunque no indican si este mismo ratio puede ser válido utilizando diferentes volúmenes y distinto número de ovocitos. Por este motivo, se realizó la segunda experiencia del presente trabajo.

5.1.2. Con un número constante de espermatozoides:ovocito

Para ver el efecto real del volumen del medio de cocultivo y del número de ovocitos presente durante el cocultivo, los ovocitos se inseminaron con un número constante de espermatozoides por ovocito (2.000 espermatozoides:ovocito), independientemente de la concentración espermática utilizada en cada grupo de tratamiento. En este caso, en primer lugar no existieron interacciones significativas entre los dos parámetros analizados (volumen de medio y número de ovocitos) y las diferencias en las tasas de penetración, monospermia y en el rendimiento final del sistema, entre los distintos grupos, fueron menores a las obtenidos fecundando con una concentración constante de espermatozoides/ml. Por tanto, de acuerdo con Rath (1992) se puede considerar desde estos resultados que el porcentaje de polispermia depende más del número absoluto de espermatozoides en el cocultivo que de la concentración espermática. Efectivamente, en todos los grupos estudiados en esta segunda experiencia, se superó el 60% de penetración y el 50% de penetraciones monosperómicas, dando como resultado un rendimiento superior en todos los casos al 36% y con capacidad de desarrollo embrionario determinada por la capacidad de los embriones para alcanzar el estadio de blastocisto, superior al 14%.

Al analizar el efecto individual de cada factor estudiado se puede observar que el empleo de volúmenes elevados de medio de cocultivo (2 ml) conlleva una disminución significativa del rendimiento de la FIV, así como de los porcentajes de división embrionaria y de formación de blastocistos con respecto al grupo de 0'1 ml (36'90% vs. 45'94%; 67'9% vs.74'46%; 19'89% vs. 29'38%). Aunque con la utilización de un volumen de 2 ml, los porcentajes de monospermia y el número medio de espermatozoides por ovocito fueron similares a los obtenidos en el grupo de bajo volumen, los índices de penetración disminuyeron significativamente, siendo ésta la razón del menor rendimiento obtenido en este grupo. Esta disminución en los porcentajes de penetración en el grupo de 2 ml de volumen podría ser debida al efecto dilución de las muestras seminales. Efectivamente, cuando se utiliza un volumen de medio de 0'1 ml, la dilución de las muestras seminales es 1:2 (50 microL de suspensión espermática en 50 microL de medio de cocultivo); por el contrario, al utilizar un volumen de 2 ml la dilución de los espermatozoides es de 1:40 (50 microL de suspensión espermática en 2 ml de medio de cocultivo). Si se tienen en cuenta las diluciones previas que se realizan durante la descongelación de los espermatozoides y su preparación para la FIV, la dilución final de

los espermatozoides en el grupo de 2 ml pudo ser excesiva pudiendo afectar a la supervivencia de los mismos (Maxwell y Johnson, 1999; Ashworth y cols., 1994) y por tanto al número de choques espermatozoides:ovocito.

Las diferencias observadas en el rendimiento de la FIV entre ambos grupos de volumen de medio (2 y 0'1 ml) se reflejaron en el porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto, situándose dicho porcentaje alrededor de diez puntos por encima cuando se utiliza el volumen más pequeño.

En cuanto al efecto del número de ovocitos durante el cocultivo sobre los parámetros de fecundación y desarrollo embrionario, nuestros resultados revelaron que con 30 ovocitos se mejora la formación de embriones hasta el estadio de blastocisto en comparación con los grupos de 15 ovocitos, pese a que el rendimiento de la FIV fue similar entre ambos grupos. Pese a que es difícil encontrar una explicación a estos resultados, la tendencia en cada uno de los grupos se repitió inexorablemente en todos los replicados. Recientemente, se ha comprobado que alrededor del 30% de los blastocistos obtenidos in vitro son poliploides (Mazza y Day, datos no publicados). Ésto podría indicar que al utilizar grupos de 30 ovocitos, el porcentaje de blastocistos procedente de ovocitos polispermicos fue superior. Sin embargo estos datos necesitan ser confirmados.

No obstante, a partir de los datos de estas dos experiencias y teniendo en cuenta el rendimiento de la FIV obtenido y los porcentajes de formación de blastocisto, se puede considerar que los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó un ratio espermatozoides:ovocito de 2.000:1, con un volumen de cocultivo de 0'1 ml y un número de ovocitos en el cocultivo de 30-50, aunque quedaría por determinar el porcentaje de blastocistos de origen polispermico obtenido al utilizar 15, 30 y 50 ovocitos durante el cocultivo.

En la bibliografía existe una gran variabilidad de las condiciones de cocultivo utilizadas por los diferentes autores. Así, se han utilizado concentraciones espermáticas desde 250.000 espermatozoides/ml hasta 1.000.000 de espermatozoides/ml, con una independencia total entre la concentración espermática por ml y el porcentaje de polispermia, tanto al utilizar semen fresco como congelado (Rath, 1992; Kano y cols.,

1994; Abeydeera y Day, 1997b, 1998d; Kikuchi y cols., 1999). Esta variabilidad en los niveles de polispermia entre los distintos autores se debe, fundamentalmente, a las diferentes condiciones de cocultivo empleadas, principalmente al volumen de medio y al número de ovocitos presente durante el cocultivo. Por ésto, cuando se relacionan estos mismos resultados pero teniendo en cuenta el número de espermatozoides por ovocito en vez de la concentración utilizada, se obtiene una elevada correlación ($r=0.95$) con los porcentajes de polispermia entre los diferentes autores (Rath, 1992). Bajo estas condiciones, el ratio espermatozoides:ovocito utilizado en la bibliografía ha oscilado entre 2.000:1 y 100.000:1 cuando se utiliza semen fresco (Rath, 1992; Mattioli y cols., 1989; Funahashi y cols., 1994a; Kano y cols., 1994) y entre 300:1 y 10.000:1, cuando los espermatozoides utilizados son criopreservados (Abeydeera y Day, 1997b; Wang y cols., 1998b). En los últimos años la tendencia generalizada es utilizar semen criopreservado, volúmenes de cocultivo de 0.1 ml y un número de espermatozoides por ovocito de 1.500 a 3.500 (Abeydeera y cols., 1997b). Bajo estas condiciones los rendimientos de la FIV obtenidos oscilan entre el 30 y el 50% (Abeydeera y Day, 1997b, 1998d; Funahashi y cols., 1999), resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo (46% en las dos primeras experiencias).

5.2. Efecto de la presencia de las células del cúmulus durante la FIV

El efecto positivo de las células del cúmulus durante la maduración in vitro de los ovocitos porcinos es indiscutible (Mattioli y cols., 1994; Petr y cols., 1996; Buccione y cols., 1990; Ka y cols., 1997). Además, se sabe que, in vivo, los ovocitos rodeados por las células del cúmulus y la matriz intercelular son transportados a la unión ampular-istmica formando agregados ovocitarios; estos agregados, formados por los ovocitos, las células del cúmulus y la matriz intercelular, permanecen durante algunas horas en las hembras que no han sido inseminadas, pero desaparecen rápidamente en aquellas que son inseminadas antes de la ovulación, observándose raramente células del cúmulus rodeando a los ovocitos más allá de 6 horas postovulación (Hunter, 1990). Ésto significa que en el momento de la fecundación los ovocitos se encuentran rodeados por dichas células y que la presencia de los espermatozoides en el lugar de la fecundación las disgrega rápidamente. Sin embargo, in vitro, poco se sabe acerca de la influencia de las células del cúmulus durante el cocultivo, ya que aunque parece que su presencia aumenta los

porcentajes de penetración, su efecto sobre la monospermia ha dado resultados contradictorios entre los distintos autores (Coy y cols., 1993a; Wang y cols., 1994; Ka y cols., 1997; Kikuchi y cols., 1993). Además, bajo nuestro conocimiento, no existen datos en la bibliografía sobre la capacidad de desarrollo embrionario de los ovocitos cuando éstos son fecundados en presencia de las células del cúmulus. Aunque, se ha sugerido que la denudación de los ovocitos mediante procedimientos enzimáticos (hialuronidasa) y/o mecánicos (pipeteado utilizando una pipeta Pasteur de diámetro ligeramente superior al de los ovocitos) puede ser perjudicial para la viabilidad y supervivencia de los ovocitos (Ball y cols., 1983), en la actualidad en la mayoría de los sistemas de FIV se eliminan las células del cúmulus inmediatamente antes de cocultivar a los ovocitos con los espermatozoides (Wang y cols., 1998b; Abeydeera y cols., 1999; Funahashi y cols., 1999).

En nuestra experiencia, tras la FIV con diferentes ratios de espermatozoides por ovocito, los ovocitos con células del cúmulus intactas necesitaron un número de 8.000 espermatozoides:ovocito para que el porcentaje de ovocitos penetrados fuese similar al obtenido en el grupo control, donde se utilizaron ovocitos denudados y 2.000 espermatozoides:ovocito (72'14% y 73'51%, respectivamente). Los ovocitos rodeados por células del cúmulus y fecundados con 2.000, 3.000, 4.000 y 6.000 espermatozoides:ovocito, presentaron unos porcentajes de penetración significativamente menores que el grupo control. Según Lavy y cols., (1988), la presencia de las células del cúmulus durante la fecundación *in vitro* disminuye los resultados de fecundación de ovocitos humanos, sugiriendo que las células del cúmulus pueden actuar como una barrera para los espermatozoides. En ese sentido, Wang y cols., (1992), señalaron que los espermatozoides criopreservados-descongelados pueden tener dificultades para atravesar la masa compacta de las células del cúmulus de los ovocitos inmaduros porcinos, sin embargo apuntaron que las células expandidas que rodean a los ovocitos madurados *in vitro* juega un papel importante para completar la capacitación y/o reacción acrosómica y por lo tanto para aumentar los porcentajes de penetración. Estos mismos autores señalan el efecto positivo de dichas células sobre la motilidad espermática y sobre el mantenimiento de una calidad de los ovocitos apropiada (Wang y cols., 1994). Sin embargo, en nuestro estudio, las células expandidas del cúmulus representaron un obstáculo importante para la penetración espermática, ya que, como se ha mencionado

anteriormente, cuando se utilizaron ratios de 2.000, 3.000 y 4.000 espermatozoides por ovocito se consiguieron porcentajes de penetración inferiores al 35%, aunque la mayoría de los ovocitos penetrados bajo estas condiciones fueron monospermicos (82'72%, 94'85% y 82'59%, respectivamente). Este bloqueo a la penetración de los espermatozoides en el interior de los ovocitos fue sobrepasado utilizando 8.000 espermatozoides por ovocito, aunque desafortunadamente, se disminuyó notablemente el porcentaje de ovocitos monospermicos (36%), comparándolo incluso con el grupo de ovocitos desnudos (60%). Sólo con 6.000 espermatozoides por ovocito se pudieron equilibrar los porcentajes de penetración y monospermia (50'94% y 56'75%, respectivamente).

Se ha descrito que la presencia de las células del cúmulus intactas durante la FIV de ovocitos madurados in vivo (Coy y cols., 1993a) incrementaba el porcentaje de monospermia, en relación al obtenido con ovocitos desnudos (61% y 40% respectivamente). Otros autores, sin embargo, observaron que un 73% y un 96%, respectivamente de los ovocitos madurados in vitro y fecundados in vitro rodeados por células del cúmulus intactas fueron penetrados polispérmicamente (Kikuchi y cols., 1993 y Ka y cols., 1997), valores netamente superiores a los alcanzados cuando utilizaron ovocitos desnudos (48% y 69%, respectivamente). Si bien nuestros resultados son similares a los obtenidos con ovocitos madurados in vivo más que a los resultados de ovocitos madurados in vitro, diferencias en los medios de maduración y en la selección de los ovocitos que van a ser madurados pueden condicionar una diferente penetrabilidad de los mismos.

En ninguno de los grupos de ovocitos con células del cúmulus intactas utilizados en nuestro estudio, se obtuvo un rendimiento de fecundación aceptable (<29% en todos los casos) en comparación con el rendimiento alcanzado en el grupo control (44%). Asimismo, la presencia de células del cúmulus durante la FIV tampoco favoreció el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto en los grupos de ovocitos inseminados con 2.000, 3.000 y 4.000 espermatozoides:ovocito, aunque el desarrollo embrionario de los ovocitos rodeados por las células del cúmulus fecundados con 6.000 y 8.000 espermatozoides:ovocito fue superior al obtenido en el resto de los grupos, incluido el grupo control. Efectivamente, en estos dos grupos, el rendimiento de la fecundación fue

del 28 y 24%, respectivamente, mientras que el porcentaje de embriones que se desarrollaron hasta el estadio de blastocisto fue de 19 y 17%, respectivamente, lo cual representa un porcentaje de eficiencia cercano al 70%. Este porcentaje fue netamente superior al obtenido en el grupo control (53%). Ésto podría indicar que, como en la experiencia anterior, un número superior de ovocitos polispermicos, procedentes de los grupos de ovocitos inseminados con 6.000 y 8.000 espermatozoides:ovocito, pudieran haber alcanzado el estadio de blastocisto.

5.3. Efecto del tiempo de contacto espermatozoides-ovocitos

La modificación de la duración del periodo de cocultivo ha sido estudiada por distintos investigadores para disminuir la polispermia (Cheng y cols., 1986; Mattioli y cols., 1989; Coy y cols., 1993c; Abeydeera y Day, 1997b).

Es conocido que el porcentaje de espermatozoides capacitados que muestran una verdadera reacción acrosómica tras 2, 4 ó 6 horas de coincubación con los ovocitos permanece constante, con valores de 16-19% (Vázquez, 1991, 1993). Ésto implica que con largos periodos de cocultivo se aumenta el número de contactos efectivos entre espermatozoides y la zona pelúcida, aumentando por tanto el riesgo de las penetraciones polispermicas. Se ha demostrado que la disminución del tiempo de exposición de los ovocitos a los espermatozoides de 12-18 horas hasta 8 horas (Cheng y cols., 1986), así como la eliminación mecánica de los espermatozoides adheridos a la zona pelúcida tras 6-8 horas de coincubación (Mattioli y cols., 1989), reduce considerablemente la incidencia de polispermia. Por otro lado, cuando el tiempo de cocultivo es inferior a 4 horas, disminuye significativamente el ratio de penetración sin afectar a los porcentajes de monospermia, al menos cuando se utilizan ovocitos madurados in vivo (Coy y cols., 1993c). Por ésto, en la actualidad, en la mayoría de los laboratorios se procede a la eliminación de los espermatozoides adheridos a la zona pelúcida tras 5-6 horas de cocultivo, transfiriendo, entonces, a los ovocitos a un medio de cultivo para su desarrollo embrionario (Abeydeera y Day, 1997b).

Sin embargo, se necesita desarrollar nuevas estrategias para intentar que el número de espermatozoides con capacidad penetrante sea disminuida lo máximo posible

para alcanzar unos porcentajes de penetración y de monospermia superiores a los conseguidos en la actualidad. En este sentido, recientemente se ha planteado la posibilidad de aumentar la eficiencia de la FIV y del desarrollo embrionario reduciendo el tiempo de exposición de los gametos desde 5 horas hasta 10 minutos, pero depositando los ovocitos nuevamente en medio de fecundación sin espermatozoides de tal forma que el tiempo máximo de permanencia de los ovocitos en medio de fecundación fuera de 5 horas. Con este sistema se ha conseguido mejorar el porcentaje de penetración y de desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto (Gruppen y Nottle, 2000). Presumiblemente, una disminución de los contactos espermatozoides-ovocito debe incrementar los porcentajes de monospermia, tal y como ha sido sugerido por algunos autores (Hunter y cols., 1990).

En nuestro trabajo, se ha disminuido el tiempo de contacto espermatozoides-ovocito de 6 horas (control) hasta 60 minutos, 30 minutos y 10 minutos, manteniendo los ovocitos de cada uno de estos grupos en medio de fecundación, libre de espermatozoides, hasta que transcurrieron las 6 horas del grupo control. Con esta estrategia, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de penetración en ninguno de los grupos con respecto al control, variando los porcentajes de penetración entre el 60 y el 70%. Sorprendentemente, los ovocitos cocultivados con espermatozoides únicamente durante 10 y 30 minutos presentaron unos porcentajes de penetraciones monospermicas (40'84% y 47'16% respectivamente) significativamente inferiores ($P < 0'04$) a las obtenidas en los grupos de 60 minutos y control (63'89 y 72'31%, respectivamente). Sin embargo, el número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida aumentó a medida que el tiempo de contacto se incrementó (34, 47, 63 y 139 espermatozoides adheridos a la zona pelúcida para los grupos de 10 minutos, 30 minutos, 60 minutos y 6 horas respectivamente).

Estos resultados indican que los espermatozoides adheridos a la zona pelúcida durante los primeros minutos de coincubación son suficientes para penetrar un porcentaje de ovocitos similar al obtenido tras 6 horas de contacto. Efectivamente, el cambiar a los ovocitos a un medio de fecundación sin espermatozoides impidió nuevas adhesiones espermáticas pero no que los ya presentes en la zona pelúcida penetrasen en el interior de los ovocitos. Además, dichos espermatozoides fueron capaces de penetrar en mayor

número en el interior de cada ovocito que cuando el tiempo de contacto se elevó por encima de 60 minutos, como se demuestra por la mayor incidencia de polispermia obtenida en dichos grupos.

Nuestros resultados están en la línea de los obtenidos por Grupen y Nottle, (2000), quienes también observan un aumento del porcentaje de polispermia, aunque no significativo, cuando los ovocitos fueron coincubados durante tan sólo 10 min con respecto al grupo control (5 horas de contacto).

Se sabe que los espermatozoides criopreservados tienen limitada su capacidad de supervivencia. Por tanto, la utilización de este tipo de espermatozoides podría determinar un incremento sustancial en el medio de cocultivo de sustancias oxígeno reactivas (ROS) como consecuencia de la muerte celular (Kessopoulov y cols., 1992). Estas sustancias poseen un efecto tóxico sobre los propios espermatozoides (revisado por Conte y cols., 1999) al determinar la aparición del proceso de peroxidación lipídica (Wolff y Anderson, 1988; Aitken, 1994), el cual provoca una disminución de la capacidad fecundante de los espermatozoides, al reducir los índices de fusión espermatozoide-ovocito (revisado por Aitken, 1989; Aitken y cols., 1992a, 1992b, 1993; Aitken y West, 1990; Aitken y Buchingham, 1992) y compromete la supervivencia del resto de los espermatozoides. Por tanto, los espermatozoides adheridos a la zona pelúcida de los ovocitos de los grupos de menor tiempo de coincubación podrían sufrir en menor proporción los efectos perjudiciales de la peroxidación lipídica al encontrarse en un medio limpio de restos celulares y con los componentes necesarios para su activación (cafeína, BSA, calcio). Ésto podría determinar la mayor incidencia de polispermia observada en dichos grupos. De todas formas, se tiene muy poca información acerca de cómo afectan los restos del metabolismo celular a la penetración espermática, por lo que se requieren sucesivos estudios para poder explicar las elevadas tasas de penetraciones polispérmicas obtenidas en este trabajo.

Las consecuencias de estos elevados porcentajes de penetraciones polispérmicas en los dos primeros grupos se vieron reflejadas en los rendimientos de FIV obtenidos, siendo éstos significativamente inferiores a los conseguidos en el grupo control (27% y 29% vs. 49%, respectivamente). Estas diferencias, sin embargo, no se reflejaron en el

desarrollo embrionario, tanto a nivel del porcentaje de embriones divididos (40-50%), como a nivel del porcentaje de embriones en estadio de blastocisto (17-25%), aunque el grupo control fue el que mostró el mayor desarrollo de blastocistos (25%). Cabe destacar, que en el grupo de menor tiempo de coincubación (10 minutos), a pesar de que el rendimiento de la FIV fue del 27%, se obtuvo un 21'5% de embriones en estadio de blastocisto, lo cual representa aproximadamente una efectividad del 80%. Esta efectividad fue netamente superior a la alcanzada en los grupos de 60 minutos y 6 horas (aproximadamente del 50% en ambos). Sería interesante comprobar qué porcentaje de blastocistos fueron monospermicos, puesto que cabe la posibilidad de que al no estar en contacto con sustancias tóxicas, los ovocitos penetrados monospermicamente tuvieran más capacidad para alcanzar el estadio de blastocisto que los que han estado expuestos a restos del metabolismo celular.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1.- Cuando se utiliza un ratio de 2.000 espermatozoides por ovocito, un volumen de medio de cocultivo de 0'1 ml ofrece mejores resultados de fecundación y desarrollo embrionario que un volumen de 2 ml.

2.- El número de ovocitos presentes en el cocultivo no influye significativamente sobre los rendimientos de la fecundación in vitro, pero sí afecta a la formación de blastocistos, obteniéndose los resultados más bajos cuando se cocultivan grupos de 15 ovocitos en presencia de 2.000 espermatozoides por ovocito.

3.- Bajo nuestras condiciones in vitro, la utilización de ovocitos madurados in vitro y rodeados por las células del cúmulus durante el cocultivo determina un menor rendimiento de la fecundación in vitro, independientemente del ratio espermatozoides:ovocito empleado (2.000-8.000), en comparación al obtenido con ovocitos desnudos e inseminados con 2.000 espermatozoides:ovocito. Sin embargo, este menor rendimiento no se vio reflejado en una disminución del desarrollo embrionario en los grupos inseminados con 6.000 y 8.000 espermatozoides por ovocito.

4.- La exposición de los ovocitos a los espermatozoides durante tan sólo 10 ó 30 minutos y su posterior cultivo en medio de fecundación hasta 6 horas produce un menor rendimiento de la fecundación in vitro, como consecuencia de un aumento de los porcentajes de ovocitos penetrados por más de un espermatozoide, que cuando se utiliza un periodo de 6 horas como tiempo de cocultivo. Sin embargo, el menor rendimiento no determinó una disminución del desarrollo embrionario.

5.- En nuestro sistema in vitro, un volumen de cocultivo de 0'1 ml, un número de ovocitos desnudos durante el cocultivo de 30, un tiempo de cocultivo de 6 horas y un ratio espermatozoides:ovocito de 2.000:1 pueden ser consideradas como las condiciones más aceptables.

Resumen

7. RESUMEN

La producción in vitro de embriones porcinos ha sido conseguida en varios laboratorios, aunque con una efectividad aún muy limitada. La incidencia de las penetraciones polispermicas en los sistemas de FIV porcinas sigue siendo excesivamente elevada impidiendo así la obtención de un número aceptable de embriones viables. Para reducirla, se ha intentado imitar las condiciones fisiológicas que soportan los gametos, pero, poco se ha investigado sobre la influencia de diferentes condiciones de cocultivo in vitro. Los objetivos del presente trabajo experimental han sido estudiar: 1) el efecto de diferentes volúmenes de medio y de diferente número de ovocitos, 2) el efecto de la presencia de las células del cúmulus y 3) el efecto de una disminución del tiempo de exposición de los ovocitos a los espermatozoides, durante el cocultivo sobre los parámetros de fecundación y posterior desarrollo embrionario in vitro.

Para la realización del presente trabajo ovocitos rodeados por al menos dos capas de células del cúmulus y con ooplasma uniforme, obtenidos a partir de ovarios de cerdas prepuberales sacrificadas en un matadero industrial, fueron madurados in vitro durante 40-48 horas en TCM-199m, inseminados en medio TBMm con espermatozoides criopreservados-descongelados (durante 6 horas excepto en la experiencia 4) y cultivados en NCSU-23.

En la primera experiencia, se ha efectuado un estudio factorial (3x3) para evaluar el efecto de tres volúmenes de medio de cocultivo (2 ml, 1 ml y 0'1 ml) y de tres números de ovocitos en el cocultivo (50, 30 y 15) sobre los parámetros de fecundación, utilizando una concentración constante de espermatozoides de 6×10^5 sperm/ml. Se utilizaron un total de 987 ovocitos desnudos, revelándose un efecto significativo del volumen de medio, del número de ovocitos y de la interacción de ambos factores sobre los porcentajes de penetración, monospermia y del rendimiento obtenido ($P < 0'002$ al menos). Los mejores rendimientos se obtuvieron con volúmenes de 0'1 ml y 30-50 ovocitos durante el cocultivo ($49'87 \pm 1'81\%$ y $44'23 \pm 1'82\%$, respectivamente).

En la segunda experiencia, se estudió, mediante un diseño factorial 3x3, el efecto de tres volúmenes de cocultivo (2 ml, 1 ml y 0'1 ml) y de tres números de ovocitos durante el cocultivo (50, 30 y 15) sobre los parámetros de fecundación y desarrollo

embrionario, utilizando un ratio de 2.000 espermatozoides:ovocito. En esta experiencia se utilizaron un total de 2.732 ovocitos desnudos. No se apreció una interacción significativa entre el volumen y el número de ovocitos en el cocultivo en ninguno de los parámetros estudiado. En cuanto al volumen de medio, se reveló un efecto significativo sobre los parámetros de penetración, rendimiento y desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto, obteniéndose los mejores resultados con el volumen de 0'1 ml (74'17±2'68%, 45'94±2'23% y 29'38±2'66%, respectivamente). Según el número de ovocitos utilizados en el cocultivo se produjo un efecto significativo sobre las tasas de penetración ($P<0'001$), sobre el número medio de espermatozoides por ovocito ($P<0'034$) y sobre el porcentaje final de blastocistos ($P<0'031$) obteniéndose los mejores resultados de penetración en el grupo de 50 ovocitos por placa (76'33±1'99%) y de formación de blastocistos en el de 30 ovocitos (24'57±2'85%, 28'14±2'32% y 19'79±1'56% para 50, 30 y 15 ovocitos/placa, respectivamente).

En la experiencia 3, sobre un total de 2.546 ovocitos, se estudió la penetrabilidad y capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos rodeados por las células del cúmulus cuando estos fueron fecundados con diferentes ratios espermatozoides:ovocito (2.000:1, 3.000:1, 4.000:1, 6.000:1 y 8.000:1) utilizando como condiciones de cocultivo 0'1 ml de medio, 30 ovocitos/placa de fecundación y 6 horas de duración de cocultivo y como grupo control ovocitos desnudos y fecundados con 2.000 espermatozoides:ovocito. La penetrabilidad de los ovocitos aumentó ($P<0'05$) a medida que se incrementó el ratio espermatozoides:ovocito, alcanzándose los valores más elevados y similares al grupo control con el ratio 8.000:1 (72'14±6'48%), al contrario que la monospermia, donde los índices más elevados se obtuvieron con los ratios más bajos (82'59%-94'85%). Por este motivo, en los resultados de rendimiento no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos con células del cúmulus, estando los valores comprendidos entre el 20% y el 30%, y siendo significativamente inferiores ($P<0'007$) a los obtenidos en el grupo control, en el cual se obtuvo un rendimiento cercano al 45%. En cuanto al desarrollo embrionario, el grupo control fue el que alcanzó resultados superiores, aunque no significativamente diferentes de los grupos de 6.000 y 8.000 espermatozoides/ovocito.

En la cuarta experiencia, para estudiar el efecto de diferentes tiempos de contacto espermatozoides-ovocitos (10 minutos, 30 minutos y 60 minutos) sobre los parámetros de

fecundación y desarrollo embrionario, un total de 1.596 ovocitos desnudos fueron fecundados con 2.000 espermatozoides:ovocito, utilizando como condiciones de cocultivo 0'1 ml de medio y 30 ovocitos/placa de fecundación, y como grupo control ovocitos cocultivados durante 6 horas. En los resultados obtenidos no se observaron diferencias significativas en cuanto a las tasas de penetración entre los distintos grupos, aunque el porcentaje de ovocitos penetrados monospermicamente aumentó significativamente ($P < 0'04$) a medida que aumentaba el tiempo de contacto ($40'84 \pm 2'09\%$, $47'16 \pm 5'61\%$, $63'89 \pm 4'42\%$ y $72'31 \pm 2'61\%$ para los grupos coincubados 10 minutos, 30 minutos, 60 minutos y 6 horas, respectivamente), de forma que el rendimiento final fue inferior significativamente en los grupos de 10 y 30 minutos con respecto al grupo control. Sin embargo y pese a estas diferencias en el rendimiento de la fecundación, no existieron diferencias significativas en los porcentajes de desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto.

Summary

8. SUMMARY

Research progress in the in vitro production of porcine embryos has been made in several laboratories by modification of conditions during IVM/IVF/IVC. However, the efficiency of production of in vitro blastocyst and offspring still remains relatively low due in part to the high incidence of polyspermy penetration. It is not known if the abnormally high incidence of polyspermy is related to conditions at the time of male and female gametes co-incubation. Thus, the aims of this study was to determine: 1) the effect of the volume of co-incubation medium (VM) and the number of oocytes (NOOC), 2) the effect of cumulus cells during IVF and 3) effect of short-times that oocytes are exposed to the sperm during IVF on the efficiency of pig IVF.

For this study oocytes surrounded by a compact cumulus mass and with an evenly granulated cytoplasm, recovered from the ovaries of slaughtered prepubertal gilts were matured in TCM199m (40-48 hours), inseminated in TBMm with frozen-thawed spermatozoa (for 6 hours except in experiment 4) and cultured for embryo development in NCSU23.

To reach the first objective, (experiment 1), 987 denuded oocytes were transferred to (2 ml, 1 ml and 0.1 ml of IVF medium) in 50, 30 and 15 oocytes groups, inseminated with 6×10^5 sperm/ml, in a 3 x 3 factorial experiment. Significant differences were found in penetration, monospermy and efficiency rates with volume of medium, number of oocytes and interactions ($P < 0.002$ at least). The low volume, 0.1 ml with 30-50 oocytes showed the highest efficiency rates ($49.87 \pm 1.81\%$ and $44.23 \pm 1.82\%$, respectively). Due to the interactions between factors and the high sperm concentration, 2,732 matured oocytes were denuded and inseminated with the same conditions (three volume of IVF medium, and three numbers of oocytes during the co-incubation) with 2,000 sperm:oocyte (experiment 2). A significant increase in penetration, efficiency and embryo development to the blastocyst stage rates was observed with the low volume, 0.1 ml ($74.17 \pm 2.68\%$, $45.94 \pm 2.23\%$ and $29.38 \pm 2.66\%$, respectively). With the number of oocytes, significant differences were observed in penetration rate ($P < 0.001$), the mean number of spermatozoa in penetrated oocytes ($P < 0.034$) and the blastocyst formation ($P < 0.031$), 50 oocytes showed the highest penetration rate ($76.33 \pm 1.99\%$) and with 30 oocytes the

highest blastocyst formation ($24.57 \pm 2.85\%$, $28.14 \pm 2.32\%$ and $19.79 \pm 1.56\%$, 50, 30 and 15 oocytes, respectively).

To evaluate the effect of the presence of cumulus cells during IVF, matured oocytes surrounded by cumulus cells, were inseminated with different spermatozoa:oocytes rates (2.000:1, 3.000:1, 4.000:1, 6.000:1 and 8.000:1), in 0.1 ml of volume IVF medium, with 30 oocytes. Denuded matured oocytes inseminated with 2.000 spermatozoa:oocyte were the control group. In all the studied groups the penetration rate increased with the sperm:oocyte ratio, reaching the highest rates like the control group with 8.000:1 sperm:oocyte ($72.14 \pm 6.48\%$), however, the monospermy was highest with the lower sperm:oocyte rates (82.59% - 94.85%). The rate of efficiency was not significantly affected between all the cumulus cells groups (20%-30%), and significantly lower than the control group (45%, $P < 0.007$). The embryo development was highest in the control group but not significantly with the 6.000:1 and 8.000:1 spermatozoa:oocyte groups.

Finally, to determine whether the efficiency of in vitro pig embryo production could be increased by reducing the time that oocytes are exposed to the sperm during IVF, groups of 30 matured denuded oocytes, in 0.1 ml of IVF volume medium, were exposed to the same sperm:oocyte rate (2.000:1) for 10 min, 30 min., 60 min. and then transferred with the zona-bound sperm to a second droplet (containing no sperm) until 6 hours (control). The penetration rates weren't significantly different between groups and the control group, however the monospermy rate was highest significantly ($P < 0.04$) increasing the coincubation time ($40.84 \pm 2.09\%$, $47.16 \pm 5.61\%$, $63.89 \pm 4.42\%$ and 72.31 ± 2.61 for 10min, 30 min, 60 min and control group respectively), thus the efficiency of IVF was significantly lower in 10 and 30 min groups than the control. However, there weren't significant differences in blastocyst formation rates between all groups and the control group.

Abreviaturas

9. ABREVIATURAS

<i>ADN</i>		Ácido desoxirribonucleico
AMPc		Adenosínmonofosfato cíclico
BECM	Beltsville Embryo Culture Medium	
BF5	Beltsville F5	
BLASTO		Blastocistos
BMOC	Brinster Modified Oocyte Culture	
BO	Brackett Oliphant	Medio de Brackett y Oliphant
BSA		Albúmina sérica bovina
BTS	Beltsville Thawing Solution	
CIV		Cultivo in vitro
COC		Complejos cúmulus-ovocito
CZB	Chalot-Ziomec-Bavister	
dbcAMP		Dibutilil adenosínmonofosfato cíclico
DE		Desarrollo embrionario
DIV		División
EDTA		Ácido etilendiamino tetra-acético
EGF		Factor de crecimiento epidérmico
EO		Nº medio de espermatozoides por ovocito penetrado
Esperm		Espermatozoides
Espz		Espermatozoide
FCS	Fetal calf serum	Suero fetal bovino
FFp		Fluido folicular porcino
FIV		Fecundación in vitro
FSH		Hormona folículo estimulante
FSP	Follicular shell pieces	Células de la granulosa y de la teca
GRGDSP		Secuencia sintética de los péptidos Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro
hCG		Gonadotropina coriónica humana
HEPES		N-[2-Hidroxietyl]piperacina-N]-[2-ácido etanolsulfónico]

IGF-I		Factor de crecimiento insulínico
ISU	Iowa State University	
KRB		Krebs Ringer bicarbonato
LEY		Lactosa-yema
LEYGO		Lactosa-yema-glicerol-Orvus Es Paste
LH		Hormona luteinizante
MC		Maduración citoplasmática
MCE		Medio de cultivo in vitro de embriones
MF		Medio de fecundación in vitro
MII		Metafase II
MIV		Maduración in vitro
MLE		Medio de lavado de los espermatozoides
MLO		Medio de lavado de ovocitos
MM		Medio de maduración in vitro
MN		Maduración nuclear
MONOSP		Monospermia
MPGF		Factor promotor del crecimiento del pronúcleo masculino
MT		Medio de transporte y lavado de ovarios
mWM	modified Whitten's Medium	
NCSU	North Caroline State University	
NOOC		Número de ovocitos por placa de cocultivo
OMI		Factor inhibidor de la meiosis
ovo		Ovocito
P		Probabilidad
PBSDm		Solución salina fosfatada de Dulbecco modificada

PEN		Penetrados
PF		Parámetros de fecundación
PNM		Pronúcleo masculino
PVA		Polivinil alcohol
RENDIM		Rendimiento
RGD		Secuencia sintética de péptidos Arg-Gly-Asp
ROS		Sustancias oxígeno reactivas
TBMm		Medio Tris buffered modificado
TES		N-tris (hidroximetil) metil-2-aminoetano ácido sulfónico
TIMP-1	Tissui inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1	
TLH		Tirode-Lactato-Hepes
TLP-PVA		Tirode-Lactato-Piruvato-Polivinilalcohol
TRIS		(Hidroximetil) amino metano
UUT		Unión útero-tubárica
VG		Vesícula germinal
VM		Volumen de medio de cocultivo

Bibliografía

10. BIBLIOGRAFÍA

ABEYDEERA, L.R.; DAY, B.N. (1997a). *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified Tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology*, 48: 537-544.

ABEYDEERA, L.R.; DAY, B.N. (1997b). Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified Tris-buffered medium with Frozen-Thawed ejaculated spermatozoa. *Biol. Reprod.* 57: 729-734.

ABEYDEERA, L.R.; WANG, W.H.; CANTLEY, T.C.; RIEKE, A.; DAY, B.N. (1998a). Coculture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after *in vitro* fertilization: relevance to intracellular glutathione. *Biol. Reprod.* 58:213-218.

ABEYDEERA, L.R.; WANG, W.H.; CANTLEY, T.C.; PRATHER, R.S.; DAY, B.N. (1998b). Presence of β -Mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 50:747-756.

ABEYDEERA, L.R.; WANG, W.H.; CANTLEY, T.C. (1998c). Presence of epidermal growth factor during *in vitro* maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 51:395-401.

ABEYDEERA, L.R.; WANG, W.H.; PRATHER, R.S.; DAY, B.N. (1998d). Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Biol. Reprod.* 58:1316-1320.

ABEYDEERA, L.R.; JOHNSON, L.A.; WELCH, G.R.; WANG, W.H.; BOQUEST, A.C.; CANTLEY, T.C.; RIEKE, A.; DAY, B.N. (1998e). Birth of piglets preselected for gender following *in vitro* fertilization of *in vitro* matured pig oocytes by X and Y chromosome bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry. *Theriogenology*, 50:981-988.

ABEYDEERA, L.R.; WANG, W.H.; CANTLEY, T.C.; RIEKE, A.; PRATHER, R.S.; DAY, B.N. (1999). *Epidermal growth factor can enhance the developmental competence of pig oocytes matured in vitro under protein-free culture conditions.* Theriogenology, 51:365 (Abstr.).

AKTAS, H.; WHEELER, M.B.; ROSENKRANS, C.F.; FIRST, N.L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. (1995). *Maintenance of bovine oocytes in profase of meiosis I by high (cAMP).* J. Reprod. Fertil. 105: 227-235.

AINSWORTH, L.; TSANG, B.K.; DOWNEY, B.R.; MARCUS, G.J.; ARMSTRONG, D.T. (1980). *Interrelationships between follicular fluid steroid levels, gonadotropic stimuli, and oocyte maturation during preovulatory development of porcine follicles.* Biol. Reprod. 23:621-627.

AITKEN, R.J. (1989). *The role of free oxygen radicals and sperm function.* Int. J. Androl. 12:95-97.

AITKEN, R.J.; WEST, F.M. (1990). *Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients.* Int. J. Androl. 13:433-451.

AITKEN, R.J.; BUCKINGHAM, D. (1992). *Enhanced detection of reactive oxygen species produced by human spermatozoa with 7-dimethyl amino-naphthalin-1,2-dicarboxylic acid hydrazide.* Int. J. Androl. 15:211-219.

AITKEN, R.J.; BUCKINGHAM, D.W.; WEST, F.M. (1992a). *Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence.* J. Cell. Physiol. 151:466-477.

AITKEN, R.J.; BUCKINGHAM, D.W.; WEST, F.M.; WU, F.C.; ZIKOPOULOS, K.; RICHARDSON, D.W. (1992b). *Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors.* J. Reprod. Fertil. 94:451-462.

AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D.W. (1993). *Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function.* J. Reprod. Fertil. 98:257-265.

AITKEN, R.J. (1994). *A free radical theory of male infertility.* En: *The infertile male: Advances assisted reproductive technology.* Reprod. Fertil. Dev. 6:19-24.

ASHWORTH, P.J.C.; HARRISON, R.A.P.; MILLER, N.G.; PLUMMER, J.M.; WATSON, P.J. (1994). *Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma.* Reprod. Fertil. Develop. 6:173-180.

BAKER, R.D.; POLGE, C. (1976). *Fertilization in swine and cattle.* Can. J. Anim. Sci. 56:105-119.

BALL, G.O.; LEIBFRIED, M.L.; JENZ, R.W.; AX, R.L.; BAVISTER, B.D.; FIRST, N.L. (1983). *Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes.* Biol. Reprod. 28:717-725.

BAVISTER, B.D. (1989). *A consistently successful procedure for in vitro fertilization of golden hamster eggs.* Gamete Res. 23:139-158.

BAVISTER, B.D. (1995). *Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts.* Hum. Reprod. Update. 1: 91-148.

BARROS, C.; YANAGIMACHI, R. (1972). *Polyspermy-preventing mechanisms in the golden hamster egg.* J. Exp. Zool. 180:251-266.

BECKMANN, L.S.; CANTLEY, T.C.; RIEKE, A.R.; DAY, B.N. (1990). *Development and viability of one and two-cell porcine embryos cultured through the four-cell block.* Theriogenology, 33:193.

BECKMANN, L.S.; DAY, B.N. (1993). *Effects of media NaCl concentration and osmolarity on the culture of early-stage porcine embryos and the viability of embryos cultured in a selected superior medium.* Theriogenology, 39:611-622.

BERGER, T.; HORTON, M.B. (1988). *Evaluation of assay conditions for the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility.* Gamete Res. 19:101-111.

BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J.; EVANS, J.F.; DRESSEL, M.A. (1982). *Normal development following in vitro fertilization in the cow.* Biol. Reprod. 27:147-158.

BRACKETT, B.G.; KCEFER, C.L.; TROOP, C.G.; DONAWICK, W.J.; BENNET, K.A. (1984). *Bovine twins resulting from in vitro fertilization.* Theriogenology, 21:224.

BRINSTER, R.L. (1969). *Mammalian embryo culture.* In *The Mammalian Oviduct* pp 419-444 Ed. ESE Hafez and R.J. Blandau. University of Chicago Press. Chicago.

BRONSON, R.A.; FUSI, F. (1990). *Evidence that an Arg-Gly-Asp (RGD) adhesion sequence plays a role in mammalian fertilization.* Biol. Reprod. 43:1019-1025.

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, E.C.; EPPIG, J.J. (1990). *Interactions between somatic cells and germ cells oogenesis.* Biol. Reprod. 43:543-547.

CHANG, M.C. (1959). *Fertilization of rabbit ova in vitro.* Nature. 84:466-467.

CHANG, M.C.; HANADA, A.; HUNT, D.M. (1971). *Fertilization of denude rabbit eggs in vitro by sperm recovered from the uterus or vagina.* Nature, 232:343-344.

CHATOT, C.L.; ZIOMEK, C.A.; BAVISTER, B.D.; LEWIS, J.L.; TORRES, I. (1989). *An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro.* J. Reprod. Fertil. 86:679-688.

CHENG, W.T.K. (1985). *In Vitro Fertilization of Farm Animal Oocytes.* PhD thesis. Council for National Academic Awards, Cambridge.

CHENG, W.T.K.; POLGE, C.; MOOR, R.M. (1986). *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes. *Theriogenology*, 25:146, (Abstr).

CHOI, Y.H.; SAITO, S.; OGURI, N. (1995). *In vitro* development of porcine oocytes fertilized *in vitro* with spermatozoa preincubated in two different media. *Theriogenology*, 44:287-294.

CLARKE, RN.; JOHNSON, L.A. (1987). Effect of liquid storage and cryopreservation of boar spermatozoa on acrosomal integrity and penetration of zona-free hamster ova *in vitro*. *Gamete Res.* 16:193-204.

CONTE, G.; MILARDI, D.; De MARINIS, L.; MANCINI, A. (1999). Reactive oxygen species in male fertility. Review of literature and personal observations. *Panminerva Med.* 41:45-53.

COSKUN, S.; LIN, Y.C. (1993). Site of action of epidermal growth factor (EGF) on *in vitro* porcine oocyte maturation. *Endocrine*, 1:87-91.

COSKUN, S.; LIN, Y.C. (1995). Mechanism of action of epidermal growth factor induced porcine oocyte maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 42:311-317.

COY, P.; MARTÍNEZ, E.; RUIZ, S.; VÁZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; GADEA, J. (1993a). Environment and medium volume influence *in vitro* fertilisation of pig oocytes. *Zygote*, 1:209-213.

COY, P.; MARTÍNEZ, E.; RUIZ, S.; VÁZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; MATAS, C. (1993b). Sperm concentration influences fertilization and male pronuclear formation *in vitro* in pigs. *Theriogenology*, 40:539-546.

COY, P.; MARTÍNEZ, E.; RUIZ, S.; VÁZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; MATAS, C.; PELLICER, M.T. (1993c). *In vitro* fertilization of pig oocytes after different coincubation intervals. *Theriogenology*, 39:1201-1208.

CRAN, D.G.; CHENG, W.T.K. (1986). *The cortical reaction in pig oocytes during in vivo and in vitro fertilization.* Gamete Res. 13:241-251.

CRAN, D.G.; ESPER, C.R. (1990). *Cortical granules and the cortical reaction in mammals.* J. Reprod. Fertil. Suppl. 42:177-188.

CROSS, P.C.; BRINSTER, R.L. (1970). *In vitro development of mouse oocytes.* Biol. Reprod. 3:298-307.

DAEN, F.P.; SATO, E.; NAITO, K.; TOWODA, Y. (1994). *The effect of pig follicular fluid fractions on cumulus expansion and male pronucleus formation in porcine oocytes matured and fertilized in vitro.* J. Reprod. Fertil. 101:667-673.

DANDEKAR, P.; TALBOT, P. (1992). *Perivitelline space of mammalian oocytes: extracellular matrix of unfertilized oocytes and formation of a cortical granule envelope following fertilization.* Mol. Reprod. Dev. 31:135-143.

DANDEKAR, P.; MATE, K.E.; TALBOT, P. (1995). *Perivitelline space of marsupial oocytes; extracellular matrix of the unfertilized oocyte and formation of a cortical granule envelope following the cortical reaction.* Mol. Reprod. Dev. 41:368-373.

DAS, K.; STOUT, L.E.; HENSLEIGH, H.C.; TAGATZ, G.E.; PHIPPS, W.R.; LEUNG, B.S. (1991). *Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes.* Fertil. Steril. 55:1000-1004.

DAVIS, D.L.; DAY, B.N. (1978). *Cleavage and blastocyst formation by pig eggs in vitro.* J. Anim. Sci. 46:1043.

DAY, B.N.; FUNAHASHI, H. (1996). *In vitro maturation and fertilization of pig oocytes.* In: Miller RH, Pursel VG and Normal HD (eds), *Beltsville symposia in Agricultural Research II. Biotechnology's Role in the Genetic Improvement of Farm Animals.* Savoy, IL: American Society of Animal Science, 125-144.

DAY, B.N. (2000). *Reproductive biotechnologies: current status in porcine reproduction*. Anim. Reprod. Sci. 60:161-172.

DING, J.; FOXCROFT, G.R. (1992). *Follicular heterogeneity and oocyte maturation in vitro in pigs*. Biol. Reprod. 47:648-655.

DING, J.; FOXCROFT, G.R. (1994a). *Conditioned media produced by follicular shells of different maturity affect maturation of pig oocytes*. Biol Reprod. 50:1377-1384.

DING, J.; FOXCROFT, G.R. (1994b). *Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs*. Mol. Reprod. Dev. 39:30-40.

DOBRINSKY, J.R.; JOHNSON, L.A.; RATH, D. (1996). *Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development*. Biol. Reprod. 55:1069-1074.

DOWNS, S.M.; DANIEL, S.A.J.; EPPIG, J.J. (1988). *Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor: evidence for positive stimulus of somatic cell origin*. J. Exp. Zool. 245:86-96.

DUBUC, A.; SIRARD, M.A. (1995). *Effect of coculturing spermatozoa with oviductal cells on the incidence of polyspermy in pig in vitro fertilization*. Mol. Reprod. Dev. 41:360-367.

DUCIBELLA, T.; RANGARAJAN, S.; ANDERSON, E. (1988). *The development of mouse oocyte cortical reaction competence is accompanied by major changes in cortical vesicle and not cortical granule depth*. Dev. Gio. 130:789-792.

EPPIG, J.J. (1979). *Gonadotropin stimulation of the expansion of cumulus oophori isolated from mice: general conditions for expansion in vitro*. J. Exp. Zool. 208:11.

EPPIG, J.J. (1996). *Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals.* *Reprod. Fertil. Dev.* 8:485-489.

FRASER, L.R.; DANDERKAR, P.V.; VAINDYA, R.A. (1971). *In vitro fertilization of tubal rabbit ova partially or totally denuded of follicular cells.* *Biol. Reprod.* 4:229-233.

FRASER, L.R. (1995). *Ionic control of sperm function.* *Reprod. Fertil. Dev.* 7:905-925.

FRENCH, A.J.; ZVIEDRANS, P.; ASHMAN, R.J.; CECIL, A.; SEAMARK, R.F. (1993). *Viability of porcine embryos cultured in simple media.* *Theriogenology*, 39:219 (Abstr.).

FUKUI, Y.; ONO, H. (1989). *Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes.* *J. Reprod. Fert.* 86:501-506.

FUNAHASHI, H.; DAY, B.N. (1993a). *Effects of the duration of exposure to supplemental hormones on cytoplasmic maturation in pig oocytes in vitro.* *J. Reprod. Fertil.* 98:179-185.

FUNAHASHI, H.; DAY, B.N. (1993b). *Effects of different serum supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes.* *Theriogenology*, 39:965-973.

FUNAHASHI, H.; DAY, B.N. (1993c). *Effects of follicular fluid at fertilization in vitro on sperm penetration in pig oocytes.* *J. Reprod. Fertil.* 99:97-103.

FUNAHASHI, H.; CANTLEY, T.C.; DAY, B.N. (1994a). *Different hormonal requirement of porcine oocyte-complexes during maturation in vitro.* *J. Reprod. Fertil.* 101:159-165.

FUNAHASHI, H.; CANTLEY, T.C.; STUMPF, T.T.; TERLOUW, S.L.; DAY, B.N. (1994b). *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. 51: 633-639.

FUNAHASHI, H.; STUMPF, T.T.; TERLOUW, S.L.; CANTLEY, T.C.; RIEKE, A.R.; DAY, B.N.(1994c). Developmental ability of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*, 41:1425-1433.

FUNAHASHI, H.; CANTLEY, T.C.; STUMPF, T.T.; TERLOUW, S.L.; DAY, B.N. (1994d). *In vitro development of in vitro matured porcine oocytes following chemical activation or in vitro fertilization. Biol. Reprod. 50:1072-1077.*

FUNAHASHI, H.; STUMPF, T.T.; KIM, N.H.; DAY, B.N. (1994e). *Effects of sodium chloride concentration in maturation media on histone H1 kinase (H1K) activity and cytoplasmic maturation of porcine oocytes. J. Reprod. Fertil. 13 (Abstr.):38.*

FUNAHASHI, H.; DAY, B.N. (1995). *Effect of exposure of porcine oocyte-cumulus complexes to gonadotropins. Presented at Beltsville symposia in agricultural Research XX: Biotechnology's role in the Genetic Improvement of Farm Animals, Beltsville, M.D. (Abstr.).*

FUNAHASHI, H.; STUMPF, T.T.; CANTLEY, T.C.; KIM, N.H.; DAY, B.N. (1995). *Pronuclear formation and intracellular glutathione content of in vitro-matured porcine oocytes following in vitro fertilization and/or electrical activation. Zygote, 3:273.*

FUNAHASHI, H.; DAY, B.N. (1996). *Current status of in vitro production of porcine embryos. Avances in swine biomedical research, Ed. Tumbleson and Schook. Plenum press. New York.*

FUNAHASHI, H.; KIM, N.H.; STUMPF, T.T.; CANTLEY, T.; DAY, B.N. (1996). *Presence of organic osmolytes in maturation medium enhances cytoplasmic maturation of pig oocytes. Biol. Reprod. 54:1412-1419.*

FUNAHASHI, H.; DAY, B.N. (1997). *Advances in in vitro production of pig embryos*. J. Reprod. Fertil. 52:271-283.

FUNAHASHI, H.; CANTLEY, T.C.; DAY, B.N. (1997a). *Preincubation of oocyte-cumulus complexes before exposure to gonadotropins improves the developmental ability of porcine embryos matured and fertilized in vitro*. Theriogenology, 47:679-686.

FUNAHASHI, H.; CANTLEY, T.C.; DAY, B.N. (1997b). *Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic AMP improves developmental competence following in vitro fertilization*. Biol. Reprod. 47:679-686.

FUNAHASHI, H.; MCINTUSH, E.W.; SMITH, M.F.; DAY, B.N. (1997c). *Effect of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) on early development of swine oocytes matured and fertilized in vitro*. Theriogenology, 47:277 (Abstr.).

FUNAHASHI, H.; MCINTUSH, E.W.; SMITH, M.F.; DAY, B.N. (1999). *The presence of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) during meiosis improves porcine "oocyte competence" as determined by early embryonic development after in vitro fertilization*. J. Reprod. Dev. 45:265-271.

GALEATI, G.; MODINA, S.; LAURIA, A.; MATTIOLI, M. (1991). *Follicle somatic cells influence pig oocyte penetrability and cortical granule distribution*. Mol. Reprod. Dev. 29:40-46.

GARBERS, D.L.; FIRST, N.L.; SULLIVAN, J.J.; LARDY, H.A. (1971). *Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoa respiration and motility by caffeine*. Biol. Reprod. 5:336-339.

GARBERS, D.L.; FIRST, N.L.; GORMAN, S.K.; LARDY, H.A. (1973). *The effects of cyclin nucleotide phosphodiesterase inhibitors on ejaculated porcine spermatozoa metabolism*. Biol. Reprod. 8:599-606.

GRUPEN, C.G.; NAGASHIMA, H.; NOTTLE, M.B. (1995). *Cysteamine enhances in vitro development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro*. Biol. Reprod. 53:173-178.

GRUPEN, C.G.; NAGASHIMA, H.; NOTTLE, M.B. (1997). *Role of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on porcine oocyte maturation and embryonic development in vitro*. Reprod. Fertil. Dev. 9:571-575.

GRUPEN, C.G.; NOTTLE, M.B. (2000). *A simple modification of the in vitro fertilization procedure improves the efficiency of in vitro pig embryo production*. Theriogenology, 53:422.

GWATKIN, R.B.L.; ANDERSEN, O.F.; HUTCHISON, C.F. (1972). *Capacitation of hamster spermatozoa in vitro; the role of cumulus components*. J. Reprod. Fertil. 30:389-394.

HAGEN, D.R.; PRATHER, R.S.; SIMS, M.M.; FIRST, N.L. (1991). *Development of one-cell porcine embryos to the blastocyst stage in simple media*. J. Anim. Sci. 69:1147-1150.

HAMANO, S.; TOYODA, Y. (1986). *In vitro fertilization of pig eggs with ejaculated spermatozoa preincubated at high sperm concentration*. Jap. J. Anim. Reprod. 32:177-183.

HAMANO, S.; NAITO, K.; FUKUDA, Y.; TOYODA, Y. (1989). *In vitro capacitation of boar ejaculated spermatozoa: Effect of conditioned media prepared from preincubated sperm suspension*. Gamete Res. 24:483.

HAMMOND, J.; SAMARAS, S.; GRIMES, R.; LEIGHTON, J.; BARBER, J.; CANNING, S.; GUTHRIE, H. (1993). *The role of insulin-like growth factors and epidermal growth factor-related peptides in intraovarian regulation in the pig ovary*. J. Reprod. Fertil. Suppl. 47:117-125.

HAN, Y.M.; ABEYDEERA, L.R.; KIM, J.H.; MOON, H.B.; CABOT, R.A.; DAY, B.N.; PRATHER, R.S. (1999). Growth retardation of inner cell mass cells in polyspermic porcine embryos produced in vitro. *Biol. Reprod.* 60:1110-1113.

HARMS, V.E.; SMIDT, D. (1970). In vitro fertilization of follicular and tubal eggs of swine. *Tierarz. Wschr.* 14:269-275.

HOODBHOY, T.; TALBOT, P. (1994). Mammalian cortical granules; contents, fate and function. *Mol. Reprod. Dev.* 39:439-448.

HOPE, P.C.; PITTS, S. (1973). Fertilization in vitro and development of mouse ova. *Biol. Reprod.* 8:420.

HSU, C.J.; HOLMES, S.D.; HAMMOND, J.M. (1987). Ovarian epidermal growth factor like activity. Concentrations in porcine follicular fluid during follicular enlargement. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147:242-247.

HUNTER, R.H.F.; POLGE, C. (1966). Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. *J. Reprod. Fertil.* 12:525-531.

HUNTER, R.H.F. (1967). The effects of delayed insemination on fertilization and early cleavage in the pig. *J. Reprod. Fertil.* 13:133-147.

HUNTER, R.H.F.; DZIUK, P.J. (1968). Sperm penetration of pig eggs in relation to the timing of ovulation and insemination. *J. Reprod. Fertil.* 15:199-208.

HUNTER, R.H.F.; LEGLISE, P.C. (1971). Polyspermic fertilization following tubal surgery in pigs with particular reference to the role of the isthmus. *J. Reprod. Fertil.* 24:233-246.

HUNTER, R.H.F. (1972). Local action of progesterone leading to polyspermic fertilization in pigs. *J. Reprod. Fertil.* 31:433-444.

HUNTER, R.H.F. (1973). *Polyspermic fertilization in pig after tubal deposition of excessive numbers of spermatozoa.* J. Exp. Zool. 183:57-64.

HUNTER, R.H.F.; HALL, J.P. (1974). *Capacitation of boar spermatozoa: the influence of post-coital separation of the uterus and Fallopian tubes.* Anat. Rec. 180:597-604.

HUNTER, R.H.F. (1980). *Transport and storage of spermatozoa in the female tract.* Proc. 9th Int. Congress. Anim. Reprod. & AI, 2:227-233.

HUNTER, R.H.F. (1981). *Sperm transport and reservoirs in the pig oviduc in relation to the time of ovulation.* J. Reprod. Fertil. 63:109-117.

HUNTER, R.H.F. (1982). *Interrelationships between spermatozoa, the female reproductive tract, and the egg investments.* Control of Pig Reprod. Pp 49-63 Ed. DJA Cole and GR Foxcroft. Butterworths, London.

HUNTER, R.H.F.; COOK, B.; POYSER, N.L. (1983). *Regulation of oviduct function in pigs by local transfer of ovarian steroids and prostaglandins: a mechanism to influence sperm transport.* Eur. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol. 14:225-232.

HUNTER, R.H.F. (1984). *Pre-ovulatory arrest and peri-ovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct.* J. Reprod. Fertil. 71:203-211.

HUNTER, R.H.F. (1988). *Transport of gametes, selection of spermatozoa, and gamete lifespans in the female tract.* En: "The Fallopian Tubes", Springer-Verlag, Berlin, IV: 53-81.

HUNTER, R.H.F.; NICHOL. (1988). *Capacitation potential of the Fallopian tube; a study involving surgical insemination and the subsequent incidence of polyspermy.* Gamete Res. 21:255-266.

HUNTER, R.H.F. (1990). *Fertilization of pig eggs in vivo and in vitro.* J. Reprod. Fertil. Suppl. 40:211-226.

HUNTER, R.H.F. (1991). Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Mol. Reprod. Dev.* 29:385-391.

HUNTER, R.H.F. (1996). Ovarian control of very low sperm/egg ratios at the commencement of mammalian fertilization to avoid polyspermy. *Mol. Reprod. Dev.* 44:417-422.

HYTELL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47:23-32.

IRITANI, A.; NIWA, K.; IMAI, H. (1978). Sperm penetration of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.* 54:379-383.

IWAMATSU, T.; CHANG, M.C. (1971). Factors involved in the fertilization of mouse eggs *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 26:197-208.

JONES, R.; BROWN. (1987). Identification of a zona-binding protein from boar spermatozoa as proacrosin. *Exp. Cell. Res.* 171:505.

JONES, R. (1990). Identification and functions of mammalian sperm egg recognition molecules during fertilization. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 42:89-105.

JONES, R. (1991). Interaction of zona pellucida glycoproteins, sulphated carbohydrates and synthetic polymers with proacrosin, the putative egg-binding protein from mammalian spermatozoa. *Dev.* 111:1155-1163.

JUFEN, Q.; ZHINING, H.; YONG, Z.Y.; JIANCHEN, W. (1991). *In vitro* capacitation of ejaculated spermatozoa and *in vitro* fertilization in dairy goats. *Theriogenology*, 35:219.

KA, H.H.; SAWAI, K.; WANG, W.H.; IM, K.S.; NIWA, K. (1997). 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. 57:1478-1483.

KANO, K.; MIYANO, T.; KATO, S. (1994). Effect of oviductal epithelial cells on fertilization of pig oocytes in vitro. *Theriogenology*, 42:1061-1068.

KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B.G. (1996). *In vitro developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media.* Biol. Reprod. 55:333-339.

KESSOPOULOU, E.; TOMLINSON, M.J.; BARRAT, C.L.R.; BOLTON, A.E.; COOKE, I.D. (1992). *Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes?* J. Reprod. Fertil. 94:463-470.

KIKUCHI, K.; NAGAI, T.; MOTLIK, J. (1991). *Effects of follicle cells on in vitro fertilization of pig follicular oocytes.* *Theriogenology*, 35:225.

KIKUCHI, K.; NAGAI, T.; MOTLIK, J.; SHIOYA, Y.; IZAIKE, Y. (1993). *Effect of follicle cells on in vitro fertilization of pig follicular oocytes.* *Theriogenology*, 39:593-599.

KIKUCHI, K.; NAITO, K.; DAEN, F.P.; IZAIKE, Y.; TOYODA, Y. (1995). *Effect of follicle cells on in vitro fertilization of pig follicular oocytes.* *Theriogenology*, 39:593-599.

KIKUCHI, K.; KAZIWASAKI, N.; NOGUCHI, J.; SHIMADA, A.; TAKAHASHI, R.; HIRABAYSHI, M.; SHINO, M.; UEDA, M.; KANEKO, H. (1999). *Developmental competence, after transfer to recipients, of porcine oocytes matured, fertilized, and cultured in vitro.* Biol. Reprod. 60:336-340.

KIM, H.H.; FUNAHASHI, H.; ABEYDEERA, L.R.; MOON, S.J.; PRATHER, R.S.; DAY, B.N. (1996). *Effects of oviductal fluid on sperm penetration and cortical granule exocytosis during fertilization of pig oocytes in vitro.* J. Reprod. Fertil. 107:79-86.

KIM, H.H.; DAY, B.N.; LIM, J.G.; LEE, H.T.; CHUNG, K.S. (1997). *Effects of oviductal fluid and heparin on fertility and characteristics of porcine spermatozoa.* Zygote, 5:61-65.

KOSOWA, N.S.; KOSOWA, E.M. (1978). *The glutathione status of cells.* International Review of Cytology, 54:109-160.

LAURINCIK, J.; RATH, D.; NIEMANN, H. (1994). *Differences in pronucleus formation and first cleavage following in vitro fertilization between pig oocytes matured in vivo and in vitro.* Reprod. Fertil. 102:277-284.

LAVY, G.; BOYERS, S.P.; De CHERNEY, A.H. (1988). *Hyaluronidase removal of the cumulus oophorus increases in vitro fertilization.* J. In Vitro Fertil. Embryo Trans. 5:257-260.

LEWIS, A.M.; KAYE, P.L.; LISING, R.; CAMERON, R.D.A. (1992). *Stimulation of protein synthesis and expansion of pig blastocysts by insulin in vitro.* Reprod. Fertil. Dev. 4:119-123.

LIU, L.; DAI, Y.; MOOR, R.M. (1997). *Role of secreted proteins and gonadotropins in promoting full maturation of porcine oocytes in vitro.* Mol. Reprod. Dev. 47:191-199.

LORENZO, P.L.; ILLERA, M.J.; ILLERA, M. (1994). *Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I.* J. Reprod. Fertil. 101:697-701.

LUCAS, X. (1998). *Influencia folicular sobre la penetrabilidad y capacidad de maduración in vitro de los ovocitos porcinos inmaduros.* Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia.

LUCAS, X.; MARTÍNEZ, E.A.; ROCA, J.; VÁZQUEZ, J.M.; GIL, M.A.; PASTOR, L.M. (2001). Relationship between antral follicle size, oocyte diameters and chromatin configurations of immature oocytes in pigs. *En prensa*.

MATAS, C.; MARTÍNEZ, E.; VÁZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; GADEA, J. (1996). In vitro penetration assay of boar spermatozoa fertility: effect of various factors on the penetrability of immature pig oocytes. *Theriogenology*, 46:503-513

MARTÍNEZ, E.A. (1992). Maduración de los ovocitos porcinos. En: *Fecundación in vitro en la especie porcina*. pp. 20-32. *PORCI Monografías*. Luzán 5 S.A. ediciones. Madrid. ISSN: 1130-8451

MARTÍNEZ, E.; VÁZQUEZ, J.M.; MATAS, C.; ROCA, J.; COY, P.; GADEA, J. (1993). "Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage". *Theriogenology*, 40:547-557

MARTÍNEZ, E. (1995). Importancia de la biotecnología de la reproducción animal en la producción ganadera y en la salud humana. Martínez, Vázquez, y Roca (Eds.). ISBN. 84-605-4029-4. Murcia.

MARTÍNEZ, E.; VÁZQUEZ, J.M.; ROCA, J. (1996). Fecundación in vitro en la especie porcina. En: *Nuevas técnicas de reproducción asistida aplicadas a la producción animal*. J.J. Garde y L. Gallego (Eds). Ediciones de la Universidad de Castilla-La Mancha. Cuenca. ISBN. 84-89492-31-X. pp. 139-159

MARTÍNEZ, E.; VÁZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; BLANCO, O.; LUCAS, X.; MATAS, C.; GIL, M.A. (1998). Relationship between homologous in vitro penetration assay and boar semen fertility. *Theriogenology*, 49:317

MARTÍNEZ, E.A.; ROCA, J.; VÁZQUEZ, J.M.; LUCAS, X.; BLANCO, O.; GIL, M.A. (1999). Sperm boar variability in homologous in vitro penetration assay over an 2-year period. *Biol. Reprod.* 60:175.

MATTIOLI, M.; GALEATI, G.; SEREN, E. (1986). *Pig oocyte maturation in vitro and evaluation of their developmental capability by IVF.* Atti. Soc. It. Sci. Vet. 40:200-202.

MATTIOLI, M.; GALEATI, G.; BACCI, M.L.; SEREN, E. (1988a). *Follicular factors influence oocyte fertilizability by modulating the intercellular cooperation between cumulus cells and oocyte.* Gamete Res. 21:223-232.

MATTIOLI, M.; GALEATI, G.; SEREN, E. (1988b). *Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation.* Gamete Res. 20:177-183.

MATTIOLI, M.; BACCI, M.L.; GALEATI, G.; SEREN, E. (1989). *Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro.* Theriogenology, 31:1201-1207.

MATTIOLI, M.; BACCI, M.L.; GALEATI, G.; SERE, E. (1991). *Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes in vitro.* Theriogenology, 36:95-105.

MATTIOLI, M.; GALEATI, G.; BARBONI, B.; SEREN, E. (1994). *Concentration of cyclic AMP during the maturation of pig oocytes in vivo and in vitro.* J. Reprod. Fertil. 100:403-409.

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. (1997). *Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation.* Mol. Reprod. Dev., 46: 408-418.

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. (1999). *Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma.* Theriogenology, 52:1353-1362.

MBURU, J.N.; EINARSSON, S.; LUNDEHEIM, N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (1996). *Distribution, number and membrane integrity of spermatozoa in the pig oviduct in relation to spontaneous ovulation.* Anim. Reprod. Sci. 45:109-121.

MBURU, J.N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; EINARSSON, S. (1997). *Changes in sperm ultrastructure and localisation in the porcine oviduct around ovulation.* Anim. Reprod. Sci. 41:137-148.

MEINECKE, B.; MEINECKE-TILLMANN, S. (1979). *Effects of gonadotropins on oocyte maturation and progesterone production by porcine ovarian follicles cultured in vitro.* Theriogenology, 11:351-365.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. (1983). *Glutathione.* Ann. Rev. Biochem. 52:11-60.

MENINO, A.R.; WRIGHT, R.W. (1982). *Development of one cell porcine embryos in two culture systems.* J. Anim. Sci.54:583-588.

MISENER, M.; POLLARD, J.W.; METZGER, K. (1991). *In vitro culture of porcine embryos in CZB medium.* Theriogenology, 35:244 (Abstr.).

MIYAMOTO, H.; CHANG, M.C. (1972). *Fertilization in vitro of mouse and hamster eggs after the removal of follicular cells.* J. Reprod. Fert. 30:309-312.

MO, H.; YAN, T.Y.; SHEN, Z.W. (1991). *Isolation, characterization, and localization of the zona pellucida binding proteins of boar sperm.* Mol. Reprod. Dev. 28:124.

MOOR, R.M.; POLGE, C.; WILLADSEN, S.M. (1980). *Effect of follicular steroids on the maturation and fertilization of mammalian oocytes.* J. Embryol. Exp. Morphol. 56:319-335.

MOOR, R.M.; MATTIOLI, M.; DING, J.; NAGAI, T. (1990). *Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro.* J. Reprod. Fertil. Suppl. 40:197-210.

MORI, T.; HIRAYAMA, M.; SUZUKI, K.; SHIMIZU, H.; NAGAI, T. (1996). *Effect of casein phospho peptides and Ca²⁺ on penetration of boar spermatozoa into pig oocytes matured in vitro.* Biol. Reprod. 55:364-369.

MOTLIK, J.; CROZET, N.; FULKA, J. (1984). *Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles.* J. Reprod. Fertil. 72:323-328.

MOTLIK, J.; FULKA, J.; FLECHON, J.E. (1986). *Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation in vivo and in vitro.* J. Reprod. Fertil. 76:31-37.

NAGAI, T.; NIWA, K.; IRITANI, A. (1984) *Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes.* J. Reprod. Fertil. 70: 271-275.

NAGAI, T.; FUKUDA, Y.; TOYODA, Y. (1988a). *Effect of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro.* Gamete Res. 21:289-295.

NAGAI, T.; TAKAHASHI, T.; MASUDA, H.; SHIOYA, Y.; KUWAYAMA, M.; FUKUSHIMA, M.; IWASAKI, S.; HANADA, A. (1988b). *In vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa.* J. Reprod. Fertil. 84:585-591.

NAGAI, T.; MOOR, R.M. (1990). *Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized in vitro.* Mol. Reprod. Dev. 26:377-382.

NAGAI, T.; TAKAHASHI, T.; SHIOYA, Y.; OGURI, N. (1990). *Maturation and fertilization of pig follicular oocytes cultured in pig amniotic fluid.* Theriogenology, 34:195-204.

NAGAI, T.; TAKAHASHI, M. (1992). *Culture of in vitro matured and fertilized pig oocytes.* Proceedings of the 12th International congress on Animal Reproduction 3:1324-1326.

NAGAI, T.; DING, J.; MOOR, R.M. (1993). *Effect of follicle cells and steroidogenesis on maturation and fertilization in vitro of pig oocytes.* J. Exp. Zool. 266:146-151.

NAGAI, T. (1994). *Current status and perspectives in IVM-IVF of porcine oocytes.* Theriogenology, 41:73.

NAGAI, T.; GESHI, M.; YONAI, M.; YAMAUCHI, N. (1998). *In vitro fertilization and subsequent development of denuded porcine oocytes matured in vitro.* Theriogenology, 49:294.

NAITO, K.; FUKUDA, Y.; TOYODA, Y. (1988). *Effect of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro.* Gamete Res. 21:289-295.

NIWA, K.; OHGODA, O. (1988). *Synergistic effect of caffeine and heparin on in vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture.* Theriogenology, 30:733-741.

NIWA, K.; CHANG, M.C. (1974). *Various conditions for the fertilization of rat eggs in vitro.* Biol. Reprod. 11:463-469.

NIWA, K. (1993). *Effectiveness of in vitro maturation and in vitro fertilization techniques in pigs.* J. Reprod. Fertil. Suppl. 48:49-59.

OCAMPO, M.B.; OCAMPO, L.C.; RYU, I.S.; MORI, T.; UEDA, J.; KANAGAWA. (1993). *Effects of culture time, ovarian activity, cumulus cells and sera on the nuclear and cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro.* Anim. Reprod. Sci. 34:135-146.

OCAMPO, M.B.; OCAMPO, L.C.; MORI, T.; UEDA, J.; SHIMIZU, H.; KANAGAWA, H. (1994). *Blastocyst formation of pig embryos derived from in vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes in the amniotic fluid of a developing chick embryo.* Anim. Reprod. Sci. 37:65-73.

OVERSTREET, J.W.; KATZ, D.F.; JOHNSON, L.L. (1980). *Motility of rabbit spermatozoa in the secretions of the oviduct.* Biol. Reprod. 22:1083-1088.

PARRY, R.V.; BARKER, P.J.; JONES, R. (1992). *Characterization of low Mr zona pellucida binding proteins from boar spermatozoa and seminal plasma*. Mol. Reprod. Dev. 33:108-115.

PAVLOK, A. (1967). *Development of mouse ova in explanted oviducts: Fertilization, cultivation and transplantation*. Science, 157:1457.

PAVLOK, A. (1981) *Penetration of hamster and pig zona-free eggs by ejaculated spermatozoa preincubated in vitro*. Int. J. Fertil. 26:101-106.

PERREAULT, S.D. (1990). *Regulation of sperm nuclear reactivation during fertilization*. In *fertilization in Mammals* pp 285-296 Eds. BD Bavister, J. Cummins and E.R.S. Roldan. Serono symposia, Norwell, M.A.

PETR, J.; TEPIA, C.; ROZINEK, J.; JILAK, F. (1996). *Effect of testosterone and dibutyryl c-AMP on the meiotic competence in pig oocytes of various size categories*. Theriogenology, 46:97-108.

PETTERS, R.M.; JOHNSON, B.H.; REED, M.L.; ARCHIBONG, A.E. (1990). *Glucose, glutamine and inorganic phosphate in early development of the pig embryo in vitro*. J. Reprod. Fertil. 89:269-275.

PETTERS, R.M.; REED, M.L. (1991). *Addition of taurine or hypotaurine to culture medium improves development of one and two cell pig embryos in vitro*. Theriogenology, 35:253.

PETTERS, R.M. (1992). *In vitro culture of early stage embryos from livestock*. Tissue Culture Research Communications 11:305-313.

PETTERS, R.M.; WELLS, K.D. (1993). *Culture of pig embryos*. J. Reprod. Fertil. Suppl. 48:61-73.

POLLARD, J.W.; PLANTE, C.; KING, W.A.; HANSEN, P.J.; BETTRIDGE, K.L.; SUAREZ, S.S. (1991). Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding oviductal epithelial cells. *Biol. Reprod.* 44:102-107.

POLLARD, J.W.; PLANTE, C.; LEIBO, S.P. (1995). Comparison of development of pig zygotes and embryos in simple and complex culture media. *J. Reprod. Fertil.* 103:331-337.

POPE, C.E.; GELWICKS, E.J.; WATCHS, K.B.; KELLER, G.L.; DRESSER, B.L. (1989). *In vitro* fertilization in the domestic cat (*felis catus*): A comparison between freshly collected and cooled semen. *Theriogenology*, 31:241.

PRATHERS, R.S.; SIMS, M.M.; FIRST, N.L. (1991). Culture of porcine embryos from the one and two cell stage to the blastocyst stage in sheep oviducts. *Theriogenology*, 35:1147-1151.

PRATHERS, R.S.; DAY, B.N. (1998). Practical considerations for the *in vitro* production of pig embryos. *Theriogenology*, 49:23-32.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. (1975). Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.* 40: 99-102.

RACOWSKY, C.; MCGAUGHEY, R.W. (1982). In the absence of protein, estradiol suppressed meiosis of porcine oocytes *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 224:103-110.

RATH, D. (1992). Experiments to improve *in vitro* fertilization techniques for *in vivo* matured porcine oocytes. *Theriogenology*, 37:885-886.

RATH, C.; JOHNSON, L.A.; WELCH, G.R. (1993). *In vitro* culture of porcine embryos: development to blastocyst after *in vitro* fertilization (IVF) with flow cytometrically sorted and unsorted semen. *Theriogenology*, 39:293.

RATH, D.; NIEMANN, H.; TORRES, C.R.L. (1995). *In vitro* development to blastocyst of early porcine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Theriogenology*, 43:913-926.

RATH, D.; JOHNSON, L.A.; DOBRINSKY, J.R.; WELCH, G.R.; NIEMANN, H.(1997). Production of piglets preselected for sex following *in vitro* fertilization with X and Y chromosome-bearing spermatozoa sorted by flow cytometry. *Theriogenology*, 47:795-800.

RAYCOUDHURRY, S.S.; SUAREZ, S.S. (1991). Porcine sperm binding to oviductal explants in culture. *Theriogenology*, 36:1059-1070.

REED, M.L.; ILLERA, M.J.; PETTERS, R.M. (1992). *In vitro* culture of pig embryos. *Theriogenology*, 37:95-109.

REED, M.L.; ESTRADA, J.L.; ILLERA, M.J.; PETTERS, R.M. (1993). Effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-I and dialized porcine follicular fluid on porcine oocyte maturation *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 266:74-78.

RICHTER, L.; ROMENY, E.; WEITZE, K.F.; ZIMMERMANN, F. (1975). Deep freezing of boar semen. VII. Laboratory and field experiments using the Hulsenberg VIII extender. *Dtsch Tieraerztl Wochenschr.*, 82:155-162.

RODRÍGUEZ, M. (1999). Efecto de la adición de compuestos con capacidad antioxidante al diluyente de congelación sobre la viabilidad y capacidad fecundante de espermatozoides criopreservados de verraco. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. (1998). The porcine oviduct: the environment for sperm capacitation and fertilization. *EAAP-Meeting, Warsaw, Poland*, pp.: 1-10.

SAEKI, K.; HOSHI, M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; FIRST, N.L. (1991). *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol. Reprod.* 44:256-260.

SATHANANTHAN, A.H.; TROUNSON, A.O. (1982). *Ultrastructure of cortical granule release and zona interaction in monospermic and polyspermic human ova fertilized in vitro*. Gamete Res. 6:225-234.

SATO, E.; MIYAMOTO, H.; KOIDE, S.S. (1990). *Glycosaminoglycans in porcine follicular fluid promoting viability of oocytes in culture*. Mol. Reprod. Dev. 26:391-397.

SAWAI, K.; FUNAHASHI, H.; WANG, W.H.; NIWA, K. (1997). *Effects of cysteine in serum-free maturation medium on male pronuclear formation of maturing pig oocytes penetrated in vitro*. J. Reprod. Dev. 43:73-80.

SCHMELL, E.D.; GULYAS, B.J.; HEDRICK, J.L. (1983). *Egg surface changes during fertilization and the molecular mechanism of the block to polyspermy*. In *Mechanism and Control of animal fertilization* ed. J.F. Hartmann, pp. 365-413. New York: Academic Press.

SINGH, B.; BARBE, G.J.; ARMSTRONG, D.T. (1993). *Factors influencing resumption of meiotic maturation and cumulus expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes in vitro*. Mol. Reprod. Dev. 36:113-119.

SINGH, B.; MENG, L.; RUTLEDGE, J.M.; ARMSTRONG, D.T. (1997). *Effects of epidermal growth factor and follicle-stimulating hormone during in vitro maturation on cytoplasmic maturation of porcine oocytes*. Mol. Reprod. Dev. 46:401-407.

SORENSEN, R.A.; WASSARMAN, P.M. (1976). *Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte*. Dev. Biol. 50:531-536.

STEPTOE, P.C.; EDWARDS, R.G. (1978). *Birth after the reimplantation of an human embryo*. Lancet. 12::366.

STONE, S.L.; POMERANTZ, S.H.; SCHWARTZ-KRIPNER, A.; CHANNING, C.P. (1978). *Inhibition of oocyte maturation from porcine follicular fluid: further purification and evidence for reversible action*. Biol. Reprod. 19:585-592.

SUAREZ, S.; REDFERN, K.; RAYNOR, P.; MARTIN, F.; PHILLIPS, D.M. (1991). Attachment of boar semen to mucosal explants of oviduct in vitro: possible role in formation of a sperm reservoir. *Biol. Reprod.* 44:998-1004.

THIBAUT, C.; GERARD, M. (1973). Cytoplasmic and nuclear maturation of rabbit oocytes in vitro. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 13:145-156.

THIBAUT, C.; SZOLLOSI, D.; GERARD, M. (1987). Mammalian oocyte maturation. *Reprod. Nutr. Dev.* 27:865-896.

TOYODA, Y.; CHANG, M.C. (1974). Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *J. Reprod. Fertil.* 36:9-22.

TSAFRIRI, A.; CHANNING, C.P. (1975). An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis in vitro. *Endocrinology*, 96:922-927.

VÁZQUEZ, J.M. (1991). *Fecundación in vitro en la especie porcina: Análisis de la capacitación y reacción acrosómica. Tesis doctoral, Universidad de Murcia.*

VÁZQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, E.; ROCA, J.; COY, P.; PASTOR, L.M. (1993). Acrosome reaction of boar spermatozoa in homologous in vitro fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 36:84-88.

WANG, W.H.; NIWA, K.; OKUDA, K. (1991). In-vitro penetration of pig oocytes matured in culture by frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 93:491-496.

WANG, W.H.; ABEYDEERA, L.R.; OKUDA, K.; NIWA, K. (1994). Penetration of porcine oocytes during maturation in vitro by cryopreserved ejaculated spermatozoa. *Biol. Reprod.* 50:510-515.

WANG, W.H.; NIWA, K. (1995a). *Synergistic effects of epidermal growth factor and gonadotropins on the cytoplasmic maturation of pig oocytes in a serum-free medium.* *Zygote*, 3:345-350.

WANG, W.H.; NIWA, K. (1995b). *Effects of epidermal growth factor (EGF) and gonadotropins on cumulus expansion and nuclear maturation of pig oocytes in serum-free medium.* *Assist. Reprod. Technol. Androl.* 7:41-55.

WANG, W.H.; ABEYDEERA, L.R.; FRASER, L.R.; NIWA, K. (1995c). *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.* 104:305-313.

WANG, W.H.; HOSOE, M.; SHIOYA, Y. (1997a). *Induction of cortical granule exocytosis of pig oocytes by spermatozoa during meiotic maturation.* *J. Reprod. Fertil.* 109:247-255.

WANG, W.H.; SUN, Q.Y.; HOSOE, M.; SHIOYA, Y.; DAY, B.N. (1997b). *Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation.* *Biol. Reprod.* 56:1376-1382.

WANG, W.H.; HOSOE, M.; LI, R.F.; SHIOYA, Y. (1997c). *Development of the competence of bovine oocytes to release cortical granules and block polyspermy after meiotic maturation.* *Dev. Growth. Differ.* 39:607-615.

WANG, W.H.; ABEYDEERA, L.R.; CANTLEY, T.; DAY, B.N. (1997d). *Effect of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by in vitro fertilization.* *J. Reprod. Fertil.* 111:101-108.

WANG, W.H.; MACHATY, Z.; ABEYDEERA, L.R.; PRATHER, R.S.; DAY, B.N. (1998a). *Parthenogenetic activation of porcine oocytes with calcium ionophore and the block to sperm penetration after activation.* *Biol. Reprod.* 58: 1357-1366.

WANG, W.H.; ABEYDEERA, L.R.; PRATHER, R.S.; DAY, B.N. (1998b). *Morphologic comparison of ovulated and in vitro matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after in vitro fertilization.* Mol. Reprod. Dev. 49:308-316.

WANG, W.H.; ABEYDEERA, L.R.; HAN, Y; PRATHER, R.S.; DAY, B.N. (1999a). *Morphologic evaluation and actin filament distribution in porcine embryos produced in vitro and in vivo.* Biol. Reprod. 60:1020-1028.

WANG, W.H.; MACHATY, Z.; ABEYDEERA, L.R.; PRATHER, R.S.; DAY, B.N. (1999b). *Time course of cortical and zona reactions of pig oocytes upon intracellular calcium increase induced by thimerosal.* Zygote, 7:79-86

WASSARMAN, P.M. (1988). *Zona pellucida glycoproteins.* Ann. Rev. Biochem. 57:415-442.

WESTENDORFF, P.; RICHTER, L.; TREU, H. (1975). *Zur Tiergefrierung von Ebersperma: Labor und Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Pailleten Verfahren.* Dtsch. Tierärztl. Wschr., 82: 261-267.

WHITTEN, W.K.; BIGGERS, J.D. (1968). *Complete development in vitro of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium.* J. Reprod. Fertil. 17:399-401.

WISEMAN, D.L.; HENDRICKS, D.M.; EBERHARDT, D.M.; BRIDGES, W.C. (1992). *Identification and content of insulin-like growth factors in porcine oviductal fluid.* Biol. Reprod. 47:126-132.

WOLFF, H.; ANDERSON, D.J. (1988). *Inmunohistologic characterization and quantification of leukocyte subpopulations in human semen.* Fertil. Steril. 49:497-504.

WRIGHT, R.W. (1977). *Successful culture in vitro of swine embryos to the blastocyst stage.* J. Anim. Sci. 44:854-858.

XIA, P.; TEKPETEY, F.R.; ARMSTRONG, D.T. (1994). *Effect of IGF-I on pig oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development in vitro, and on granulosa and cumulus cell biosynthetic activity.* Mol. Reprod. Dev. 38:373-379.

XIA, P.; RUTLEDGE, J.; ARMSTRONG, D.T. (1995). *Expression of glycine cleavage system and effect of glycine on in vitro maturation, fertilization and early embryonic development in pigs.* Anim. Reprod. Sci. 38:155-165.

YANAGIMACHI, R. (1988). *Mamalian fertilization.* In: *The Physiology of Reproduction*, ed. E. Knobil and J. Neill, pp.135-185. New York: Raven Press.

YANAGIMACHI, R. (1994). *Mammalian fertilization.* In: *Knobil E. Neill J.D. (eds.), The Physiology of Reproduction. 2nd edition.* New York: Raven Press: 189-317.

YANG, C.H.; YANAGIMACHI, R. (1989). *Differences between mature ovarian and oviductal oocytes: a study using the golden hamster.* Hum. Reprod. 4(1):63-71.

YOSHIDA, M. (1987). *In vitro fertilization of pig oocytes matured in vivo.* Jpn. J. Vet. Sci. 49:711-718.

YOSHIDA, M. (1989). *Improved viability of two-cell stage pig embryos resulting from in vitro fertilization of oocytes matured in vivo.* Jpn. J. Anim. Reprod. 35:34-37.

YOSHIDA, M.; BAMBA, K.; KOJIMA, Y. (1989). *Effects of gonadotropins and estradiol-17 β on the timing of nuclear maturation and cumulus mass expansion on pig oocytes cultured in vitro.* Jpn. J. Anim. Reprod. 35:86-91.

YOSHIDA, M.; ISHIZAKI, Y.; KAWAGISHI, H. (1990). *Blastocyst formation by pig embryos resulting from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro.* J. Reprod. Fertil. 88:1-8.

YOSHIDA, M.; ISHIZAKI, Y.; KAWAGISHI, H.; BAMBA, K.; KOJIMA, Y. (1992a). *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. 95:481-488.

YOSHIDA, M.; ISHIGAKI, K.; PURSEL, V.G. (1992b). *Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured in vitro.* Mol. Reprod. Dev. 31:68-71.

YOSHIDA, M.; ISHIGAKI, K.; NAGAI, T.; CHIKYU, M.; PURSEL, V.G. (1993a). *Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus.* Biol. Reprod. 49: 89-94.

YOSHIDA, M.; MIZOGUCHI, Y.; ISHIZAKI, K.; KOJIMA, T.; NAGAI, T.; (1993b). *Birth of piglets derived from in vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro.* Theriogenology, 39: 1303-1311.

YOUNGS, C.R.; MCGINNIS, L.K. (1990). *In vitro culture of porcine embryos in Whitten's medium containing varying levels of glucose and bovine serum albumin (BSA).* Biol. Reprod. 42:58.

YOUNGS, C.R.; FORD, S.P.; MCGINNIS, L.K.; ANDERSON, L.H. (1993). *Investigations into the control of litter size in swine: I. Comparative studies on in vitro development of Meishan and Yorkshire preimplantation embryos.* J. Anim. Sci. 71:1561-1565.

YOUNIS, A.I.; BRACKETT, B.G.; FAYRER-HOSKEN, R.A. (1989). *Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro.* Gamete Res. 23:189-201.

ZHENG, Y.S.; FISER, P.; SIRARD, M.A. (1992). *The use of ejaculated boar semen after freezing in 2 or 6% glycerol for in vitro fertilization of porcine oocytes matured in vitro.* Theriogenology, 38:1065-1075.

ZHENG, Y.S.; SIRARD, M.A. (1992). *The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on in vitro maturation and fertilization of porcine oocytes.* Theriogenology, 37:779-790.