

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Patología Animal II



**ESTUDIO DE LA FECUNDACIÓN “IN VITRO” EN
PORCINO: REDUCCIÓN DE LA POLIESPERMIA Y
OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN “IN VITRO” DE
EMBRIONES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Belén Martínez Madrid

Bajo la dirección del Doctor:

Raúl Sánchez Sánchez

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-2157-5

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Patología Animal II



**ESTUDIO DE FECUNDACIÓN *IN VITRO* EN PORCINO:
REDUCCIÓN DE LA POLIESPERMIA Y OPTIMIZACIÓN
DE LA PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES**

BELÉN MARTÍNEZ MADRID

MADRID, SEPTIEMBRE DE 2002

Este trabajo ha sido financiado por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) del Ministerio de Ciencia y Tecnología mediante una beca predoctoral y el proyecto RZ00-006-C2-1

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	2
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. FISIOLÓGÍA DE LA FECUNDACIÓN PORCINA	7
2.1.1. El ovocito	7
2.1.1.1. Ovogénesis.....	7
2.1.1.2. Crecimiento del folículo y del ovocito.....	9
2.1.1.3. Maduración del ovocito.....	11
2.1.1.4. Ovulación.....	14
2.1.2. El espermatozoide	15
2.1.2.1. Espermatogénesis.....	15
2.1.2.2. Maduración final del espermatozoide.....	16
2.1.2.2.1. Epidídimo.....	16
2.1.2.2.2. Eyaculación.....	17
2.1.3. El oviducto	18
2.1.3.1. Anatomía e histología del oviducto.....	18
2.1.3.2. Fluido oviductal.....	19
2.1.3.3. Transporte del ovocito.....	20
2.1.3.4. Transporte del espermatozoide.....	20
2.1.4. Fecundación <i>in vivo</i>	21
2.1.4.1. Capacitación espermática.....	21
2.1.4.1.1. Hiperactivación espermática.....	22
2.1.4.1.2. Paso del espermatozoide a través del cúmulus.....	23
2.1.4.1.3. Unión a la zona pelúcida: unión primaria y secundaria.....	24
2.1.4.1.4. Reacción acrosómica.....	25
2.1.4.1.5. Penetración de la zona pelúcida y fusión de membranas.....	26
2.1.4.2. Activación del ovocito.....	26
2.1.4.2.1. Reacción cortical.....	27
2.1.4.2.2. Reanudación de la meiosis.....	28

	Página
2.1.4.3. Formación del pronúcleo masculino y femenino.....	28
2.1.4.4. Fusión de los pronúcleos y formación del cigoto.....	29
2.1.4.5. Mecanismos fisiológicos de prevención frente a la poliespermia.....	29
2.1.5. Desarrollo embrionario preimplantacional.....	30
2.1.5.1. Vínculos materno-embrionarios.....	30
2.1.5.2. Periodo pre-eclosión.....	31
2.1.5.2.1. División embrionaria.....	31
2.1.5.2.2. Formación del blastocisto.....	33
2.1.5.3. Eclosión y periodo post-eclosión.....	34
2.2. PRODUCCIÓN <i>IN VITRO</i> DE EMBRIONES PORCINOS.....	35
2.2.1. Maduración <i>in vitro</i>.....	37
2.2.1.1. Factores que afectan a la calidad de los ovocitos.....	38
2.2.1.1.1. Condiciones de transporte de los ovarios al laboratorio.....	38
2.2.1.1.2. Presencia de cuerpos lúteos y folículos quísticos en el ovario...38	38
2.2.1.1.3. Tamaño del folículo.....	39
2.2.1.1.4. Método de recuperación de los ovocitos.....	39
2.2.1.1.5. Criterio de selección de los complejos cúmulus-ovocito (COCs).....	40
2.2.1.1.6. Factores relativos a las hembras de las que se obtienen los ovarios.....	41
2.2.1.2. Sistema de maduración <i>in vitro</i> de los ovocitos: condiciones de cultivo y medios de maduración.....	42
2.2.1.2.1. Condiciones de cultivo.....	43
2.2.1.2.2. Medios de maduración.....	44
2.2.1.3. Modificaciones realizadas en el sistema de maduración <i>in vitro</i>	44
2.2.1.3.1. Enriquecimiento con fluido folicular porcino (PFF) en sustitución de las fuentes de proteínas séricas convencionales.....	45
2.2.1.3.2. Glutathion: adición de cisteína y otros compuestos con grupos tioles.....	46
2.2.1.3.3. Gonadotropinas: duración de la exposición hormonal.....	48
2.2.1.3.4. Adición del factor de crecimiento epidérmico (EGF).....	49

	Página
2.2.1.3.5. Células somáticas foliculares.....	51
2.2.1.3.6. Efecto negativo de altos niveles de NaCl en el medio: reducción de la concentración de NaCl y adición de sorbitol.....	53
2.2.1.3.7. Sincronización del desarrollo de los ovocitos.....	54
2.2.1.3.8. Adición de inhibidor tisular de las metaloproteinasas-1 (TIMP-1).....	55
2.2.1.3.9. Enriquecimiento con fluido oviductal porcino o con glicoproteína específica del oviducto porcino (pOSP).....	55
2.2.2. Fecundación <i>in vitro</i>	57
2.2.2.1. Factores que afectan a la penetración y a la poliespermia durante la capacitación espermática y/o la fecundación <i>in vitro</i>	60
2.2.2.1.1. Procedencia de los espermatozoides.....	60
2.2.2.1.2. Preincubación espermática.....	61
2.2.2.1.3. Concentración espermática.....	63
2.2.2.1.4. Tiempo de cocultivo de los ovocitos con el semen.....	63
2.2.2.1.5. Sistema de cocultivo de espermatozoides-ovocitos.....	64
2.2.2.1.6. Concentración de bicarbonato (HCO ₃ ⁻).....	65
2.2.2.1.7. Concentración de sodio (Na ⁺).....	67
2.2.2.1.8. Concentración de calcio (Ca ²⁺).....	67
2.2.2.1.9. Medios de fecundación <i>in vitro</i>	68
2.2.2.1.10. Suplementos del medio de fecundación.....	69
2.2.2.1.10.1. Suplementos macromoleculares.....	69
2.2.2.1.10.2. Cafeína, adenosina y péptido promotor de la fecundación (FPP).....	71
2.2.2.1.10.3. Ácido hialurónico.....	72
2.2.2.1.10.4. Glutatión (GSH).....	72
2.2.2.1.10.5. Fluido oviductal, células oviductales y glicoproteína específica del oviducto porcino (pOSP).....	73
2.2.2.1.11. Presencia de células del cúmulus durante la fecundación <i>in vitro</i>	74
2.2.2.1.12. Selección de espermatozoides con Percoll®.....	75

	Página
2.2.3. Cultivo de embriones	76
2.2.3.1. Condiciones del cultivo de embriones.....	78
2.2.3.1.1. Tensión de oxígeno.....	78
2.2.3.1.2. Relación: embriones/volumen de medio.....	79
2.2.3.2. Medios de cultivo de embriones.....	81
2.2.3.3. Composición de los medios de cultivo de embriones.....	81
2.2.3.3.1. Fuente energética.....	81
2.2.3.3.2. Fuentes proteicas: suero fetal bovino (FCS) y albúmina sérica bovina (BSA).....	85
2.2.3.3.3. Aminoácidos.....	88
2.2.3.3.4. Taurina e hipotaurina.....	91
2.2.3.3.5. Ácido hialurónico.....	91
2.2.3.4. Medios de cultivo secuenciales y sistema de cultivo en perfusión.....	92
2.2.3.5. Morfología y calidad de los embriones producidos <i>in vitro</i>	93
2.2.3.6. Valoración de la capacidad de desarrollo embrionario.....	93
2.2.3.7. Ovocitos poliespérmicos.....	94
3. MATERIAL Y MÉTODOS	97
3.1. ANIMALES UTILIZADOS	97
3.2. MEDIOS DE CULTIVO	97
3.2.1. Solución salina	98
3.2.2. Tampón fosfato salino modificado (PBSm)	98
3.2.3. Medios de maduración <i>in vitro</i> (MIV)	99
3.2.4. Medios de fecundación <i>in vitro</i> (FIV)	100
3.2.5. Medios de cultivo de embriones (CE)	102
3.2.6. Medio de conservación de los espermatozoides	103
3.3. RECOGIDA Y TRANSPORTE DE OVARIOS	104
3.4. OBTENCIÓN Y SELECCIÓN DE OVOCITOS	104

	Página
3.5. MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> (MIV).....	105
3.6. RECOGIDA Y PROCESADO DEL SEMEN.....	105
3.7. FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i> (FIV).....	107
3.7.1. Preparación de los ovocitos	107
3.7.2. Preparación de los espermatozoides	108
3.7.3. Cocultivo de ovocitos y espermatozoides	109
3.8. CULTIVO DE EMBRIONES (CE).....	110
3.8.1. Valoración microscópica de resultados	111
3.9. FIJACIÓN DE ZIGOTOS Y TINCIÓN CON HOECHST.....	111
3.9.1. Valoración microscópica de los resultados	112
3.10. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	113
3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	120
4. RESULTADOS	133
4.1. EFECTO DE LA COMPLEMENTACIÓN DEL MEDIO DE MIV CON FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF) O CON FRAGMENTOS DE PARED FOLICULAR (FPF) SOBRE LA MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> , LA FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i> Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO <i>IN VITRO</i>	133
4.1.1. Efecto de la complementación del medio de MIV con EGF o con FPF sobre la maduración <i>in vitro</i> y la fecundación <i>in vitro</i>	133
4.1.2. Efecto de la complementación del medio de MIV con EGF o con FPF sobre el desarrollo embrionario <i>in vitro</i>	135

	Página
4.2. EFECTO DEL MEDIO DE FIV Y DE LA CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA SOBRE LA PENETRACIÓN Y LA POLIESPERMIA.....	138
4.3. EFECTO DEL MÉTODO DE COCULTIVO DE LOS OVOCITOS CON LOS ESPERMATOZOIDES SOBRE LA PENETRACIÓN Y LA POLIESPERMIA.....	142
4.4. EFECTO DE LA COMPLEMENTACIÓN DEL MEDIO DE CE CON AMINOÁCIDOS Y DE LA RELACIÓN DE EMBRIONES/VOLUMEN DE MEDIO SOBRE LA DIVISIÓN Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO <i>IN VITRO</i>	145
5. DISCUSIÓN	151
6. CONCLUSIONES	165
7. RESUMEN	168
8. SUMMARY	171
9. ABREVIATURAS	174
10. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	177
10.1. ÍNDICE DE TABLAS	177
10.2. ÍNDICE DE FIGURAS	178
11. BIBLIOGRAFÍA	184

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la biotecnología de la reproducción en los animales domésticos ha experimentado un gran crecimiento, aportando nuevas técnicas que han repercutido en el desarrollo de innovadoras vías de investigación en el campo de la medicina humana, así como de la industria animal. La biotecnología de la reproducción incluye un conjunto muy diverso de técnicas, entre las que se encuentran: inseminación artificial (IA), transferencia de embriones, crioconservación de gametos y embriones, citometría de flujo para el sexaje de espermatozoides, producción *in vitro* de embriones (PIV), transferencia nuclear y microinyección de construcciones de ADN. Algunas de estas tecnologías, como es el caso de la IA, están ampliamente implantadas en porcino; sin embargo, el desarrollo de nuevas tecnologías de la reproducción en porcino está todavía retrasado respecto al bovino, a pesar del tremendo progreso que ha experimentado en estos últimos años (Niemann y Rath, 2001).

Debido a las semejanzas fisiológicas que comparte con los humanos, el cerdo se considera la especie de elección como potencial donante xenógrafo y como productor de proteínas de interés farmacéutico secretadas por la leche de animales transgénicos, obtenidos mediante microinyección de ADN en el pronúcleo del cigoto. Además, recientemente se ha conseguido clonar con éxito cerdos producidos por transferencia del núcleo de células somáticas de animales adultos al citoplasma de ovocitos maduros (Polejaeva *et al.*, 2000). Debido a que las técnicas de producción de cerdos clonados y transgénicos requieren ovocitos maduros y cigotos, respectivamente, existe un creciente interés en la producción de ovocitos maduros y embriones porcinos a gran escala, mediante técnicas de maduración y fecundación *in vitro* (MIV/FIV), con el fin de ser empleados en el campo de la investigación básica y biomédica.

La recogida de embriones de animales donantes es costosa tanto en tiempo como en dinero, y con ella se obtiene un número reducido de embriones. Por esta razón, se hace necesario conseguir una fuente alternativa que permita la obtención de ovocitos maduros y embriones a gran escala y con bajo coste, y poder así seguir avanzando en el desarrollo de la biotecnología de la reproducción. Esta vía alternativa pasaría por el uso y la

optimización de las técnicas de producción *in vitro*, empleando ovarios de matadero como la fuente más económica para generar ovocitos maduros y embriones.

Por otra parte, el sector porcino, caracterizado por un alto nivel tecnológico, supone un porcentaje muy importante de la actividad agraria europea. Este mercado tan competitivo ha impulsado un gran proceso de modernización del sector, optimizando todos los recursos y factores que intervienen en la producción porcina. Estas importantes transformaciones en los sistemas de producción intensiva, hacen a la industria porcina muy receptiva al uso de las nuevas tecnologías de la reproducción, de modo que se puedan reducir costes y se incremente la eficacia en la producción. En un futuro se podría llegar a diseñar genéticamente, gracias a la tecnología transgénica, las características productivas del animal, de modo que se contara con cerdos con un crecimiento más rápido, menor cantidad de grasa en la canal, mejores índices de conversión o mayor resistencia a enfermedades.

Por lo tanto, el interés que despierta la tecnología de la reproducción, tanto en el área de la medicina como en la industria porcina, aumenta el afán por el desarrollo de nuevas tecnologías así como la puesta en marcha de las existentes. Uno de los avances tecnológicos que más rápidamente se han desarrollado en esta década ha sido la producción *in vitro* (PIV) de embriones porcinos. Se han puesto a punto los procedimientos necesarios para la producción a gran escala de embriones: obtención de ovocitos recogidos de matadero, maduración (MIV) y fecundación (FIV) en el laboratorio.

Este éxito en la PIV, que conlleva la disponibilidad de embriones sin necesidad su recogida quirúrgica en cerdas, ha estimulado la investigación en otras áreas. Además, la disponibilidad de estos recursos permitirá la investigación de los factores que controlan el desarrollo embrionario temprano, y así evitar las grandes pérdidas económicas debidas a las altas tasas de mortalidad embrionaria temprana en la especie porcina.

Fue hace poco más de una década (Mattioli *et al.*, 1989), cuando se consiguió obtener blastocistos a partir de ovocitos porcinos madurados y fecundados *in vitro*, con establecimiento de gestaciones y nacimiento de crías vivas. A partir de ese momento, se ha ido modificando la técnica de producción *in vitro* y, en los últimos años se han logrado

progresos considerables en el desarrollo de los procedimientos de MIV, FIV y cultivo embrionario. Sin embargo, son necesarias mejoras adicionales que maximicen la producción de embriones, ya que en la actualidad el rendimiento final de la técnica no supera el 42% de blastocistos (Abeydeera *et al.*, 1998c).

La producción *in vitro* de embriones abarca tres fases principales: maduración, fecundación y desarrollo embrionario. La maduración del ovocito, dividida en maduración nuclear y citoplasmática, hace referencia a todos los cambios nucleares, citoplasmáticos y de membrana que sufre el ovocito, con el fin de prepararse para ser fecundado con éxito y desarrollarse posteriormente. Inicialmente, aunque la maduración nuclear se alcanzó sin dificultad, había dos problemas que obstaculizaban el éxito de la técnica: el bajo porcentaje de formación de pronúcleo masculino y la alta incidencia de penetraciones poliespéricas tras la fecundación *in vitro* (Day *et al.*, 2000a; Niwa, 1993; Funahashi y Day, 1997). La baja formación de pronúcleo masculino se ha atribuido a una inadecuada maduración citoplasmática (Niwa, 1993; Nagai, 1994; Mattioli *et al.*, 1988a), debido a que las condiciones iniciales de maduración no eran las óptimas. En los últimos años, la maduración citoplasmática se ha mejorado mediante modificaciones en el sistema de MIV, que han incrementado la formación del pronúcleo masculino. Sin embargo, la poliespermia continúa siendo el principal problema sin resolver en la producción *in vitro* de embriones porcinos; aunque no está claro si se debe a unas condiciones subóptimas en la MIV, en la FIV o en ambas.

Además de tratar de resolver el problema de la poliespermia, los futuros trabajos se deben centrar en mejorar la capacidad de desarrollo embrionario y la calidad de los embriones porcinos. En la actualidad se dispone de sistemas de cultivo de embriones capaces de superar el bloqueo de 4 células y soportar el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto. Sin embargo, la morfología y el número de células de los blastocistos producidos *in vitro* son inferiores comparados con sus homólogos *in vivo*.

Aunque los sistemas de producción *in vitro* disponibles son aptos para la generación de embriones porcinos, su producción a gran escala topa con muchas dificultades, siendo las principales: 1) la ineficacia de las técnicas de maduración y fecundación *in vitro*, 2) la baja capacidad de desarrollo de los embriones producidos *in*

vitro, y 3) las condiciones subóptimas de cultivo embrionario. Por lo tanto, todavía se ha de perfeccionar el sistema *in vitro*, tratando de hacer especial énfasis en los puntos anteriormente citados, de modo que se incremente la eficacia de la producción.

Tras lo anteriormente expuesto, el presente trabajo se ha planteado con el objetivo principal de optimizar el sistema de producción *in vitro* de embriones porcinos, y para ello se pretende:

1. Estudiar el efecto de modificaciones en el medio de maduración sobre la maduración citoplasmática de los ovocitos y sobre el desarrollo embrionario,
2. Estudiar el efecto de la modificación de diferentes factores que influyen sobre la fecundación *in vitro*, tales como el medio de fecundación, la concentración espermática y el sistema de cocultivo espermatozoides-ovocito, con el fin de reducir la incidencia de fecundaciones poliespérmicas,
3. Estudiar el efecto de modificaciones tanto en el medio como en el volumen de cultivo de los embriones sobre la capacidad de desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto,
4. Y finalmente, lograr una mejora global en el rendimiento de la técnica de producción *in vitro* establecida en nuestro laboratorio, gracias al conjunto de las modificaciones incorporadas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El diseño de un sistema de producción *in vitro* de embriones precisa de un conocimiento previo de los sucesos que acontecen en el proceso de fecundación *in vivo* y de las condiciones ambientales a las que van a estar sometidos los gametos masculino y femenino dentro del aparato reproductor de la hembra en las diferentes fases de dicho proceso. Como apuntó Yanagimachi (1988): “la madre naturaleza ha hecho su trabajo durante millones de años, mientras que nosotros hemos comenzado a imitarla hace muy poco; por lo tanto, hay muchas cosas que aún debemos aprender de ella”.

2.1. FISIOLOGÍA DE LA FECUNDACIÓN PORCINA

2.1.1. El ovocito

2.1.1.1. Ovogénesis

Durante el desarrollo fetal, las células germinales primordiales del ovario van a sufrir un proceso de diferenciación. Primero se transforman en ovogonias por sucesivas divisiones mitóticas, las cuales dan lugar a los ovocitos primarios al iniciarse la primera división meiótica.

La meiosis es un tipo de división celular exclusiva de las células germinales (ovogonias y espermatogonias) y su objetivo es doble: la reducción a un número haploide de cromosomas y la recombinación de la información genética (Polanski y Kubiak, 1999). Antes de sufrir la meiosis, las células germinales replican su ADN y contienen en ese momento 4 copias de ADN y un número $2n$ de cromosomas, como cualquier célula diploide; mientras que entre las dos divisiones meióticas la replicación de ADN queda suprimida, lo que asegura que los gametos resultantes sean haploides. La meiosis consiste en dos divisiones: en la primera, las dos células hijas pasan a tener $1n$ cromosomas y 2 copias de ADN; y en la segunda, las 2 células resultantes contienen $1n$ cromosomas y 1 copia de ADN. Así, con la meiosis se obtienen 4 células hijas haploides y genéticamente

diferentes, en el caso del macho; mientras que en la hembra sólo da lugar a una célula, pues las dos divisiones meióticas son asimétricas, y en cada una se forman una célula grande y otra pequeña abortiva (corpúsculo polar). De este modo, se minimiza la pérdida de productos almacenados en el ovocito, necesarios para el posterior desarrollo embrionario temprano.

En las hembras, toda la población de ovocitos entra en meiosis sincrónicamente en la vida fetal. La primera división meiótica progresa hasta que el ovocito alcanza el estadio de diplotene difuso de la profase I (estado dictiatio), donde se produce la primera detención de la meiosis, justo antes o poco después del nacimiento. A partir de este momento, el ovocito comienza a ser rodeado por células pregranulosas, las cuales forman una membrana basal alrededor de ellas, quedando formado el compartimento folicular. La primera parada de la meiosis se mantiene hasta momentos antes de la ovulación o de la atresia folicular (Tsafriri *et al.*, 1983), y es importante para asegurar que el ovocito disponga de tiempo suficiente para crecer antes de la fecundación, de modo que sea capaz de mantener el proceso de la embriogénesis.

Esta interrupción se mantiene mediante un sistema de control múltiple en el que están implicados el adenosil monofosfato cíclico (AMPc) (Schultz, 1991; Mattioli, 1994; Dekel, 1999), la hipoxantina (Stromstedt y Byskov, 1999; Dekel, 1999) y el factor inhibidor de la maduración del ovocito (Dekel, 1999), entre otros factores (Thibault *et al.*, 1987), y cuya finalidad es mantener inactivo al factor promotor de la maduración (MPF). Se ha comprobado que el MPF es un regulador universal (desde las levaduras hasta el hombre) de la transición de la fase G2 a metafase tanto en la mitosis como en la meiosis, por lo que se ha propuesto llamarle factor promotor de la metafase, manteniendo las mismas siglas. El MPF (Dekel, 1996) está constituido por una proteinkinasa (p34^{cdc2}) y una ciclina. Aunque no está muy claro el mecanismo por el que el AMPc regula la detención meiótica, parece ser que su acción en el ovocito viene mediada por la proteinkinasa A que, a través de una cascada de reacciones bioquímicas no conocidas, previene la defosforilación de la proteinkinasa p34^{cdc2}, manteniendo al MPF en un estado inactivo (Dekel, 1999)

En este estadio, los ovocitos se caracterizan por tener un núcleo prominente, denominado vesícula germinal (VG) (Franchi *et al.*, 1962), y por estar rodeados por una capa de células epiteliales (foliculares), lisas no proliferativas, conocidas como células pregranulosas, que ejercen un efecto inhibitor sobre la meiosis y el crecimiento folicular. En el momento del nacimiento, la mayoría de los ovocitos han alcanzado este estadio y se encuentran formando los folículos primordiales, siendo la única fuente de gametos femeninos en el animal sexualmente maduro.

2.1.1.2. Crecimiento del folículo y del ovocito

El ovocito y el folículo sufren un periodo de crecimiento, que se caracteriza por ser una fase de intensa síntesis proteica y de almacenamiento de macromoléculas (Moor *et al.*, 1990). El folículo primordial se transforma en folículo primario, donde el ovocito está rodeado por una capa unilaminar de células granulosas cuboides, derivadas de las pregranulosas. En el folículo primario se produce un aumento del volumen del ovocito, sin división celular del mismo, y una hiperplasia e hipertrofia de las células de la granulosa, dando lugar al folículo secundario (un folículo preantral multilaminar). En el ratón se ha identificado un factor de diferenciación del crecimiento, conocido como GDF-9, necesario en el inicio del crecimiento folicular al estimular la multiplicación de las células de la granulosa, y que solamente se expresa en el ovocito (Stromstedt y Byskov, 1999; Dong *et al.*, 1996). El crecimiento folicular va acompañado de la formación de una capa de células de la teca vascularizada alrededor de la membrana basal.

Al alcanzar las células de la granulosa un número elevado, y en respuesta a la FSH, se forma la cavidad antral repleta de fluido folicular (Canipari, 1994). Tras la formación del antro, las células de la granulosa se diferencian en dos subpoblaciones: por una parte, las células de la granulosa que revisten la pared del folículo y forman un epitelio estratificado en contacto con la lámina basal; y por otra, las células del *cumulus oophorus* que forman varias capas de células cilíndricas alrededor del ovocito (Canipari, 1994). Cuando el folículo ha formado la cavidad antral, pasa a llamarse folículo terciario, antral o de Graaf, y alcanza un diámetro aproximado de 2,2 mm (Motlik *et al.*, 1984).

El crecimiento del ovocito va unido a un aumento en el número de orgánulos citoplasmáticos, como mitocondrias, aparato de Golgi y ribosomas, y a la formación de los gránulos corticales a partir del complejo de Golgi (Stromstedt y Byskov, 1999). Toda esta maquinaria celular, indicativa de una elevada actividad metabólica, permite la síntesis y almacenamiento de ARN, proteínas y enzimas y, en las últimas etapas del crecimiento, el desarrollo de la red de microtúbulos y filamentos. También durante la fase de crecimiento se forma la zona pelúcida (ZP), una cubierta extracelular glicoproteica que rodea a los ovocitos mamíferos. La capa de células del cúmulus más próxima a la ZP se conoce con el nombre de *corona radiata*.

En esta etapa de crecimiento se van a establecer unas comunicaciones entre el ovocito y las células del cúmulus, mediante unos procesos citoplasmáticos de las células de la *corona radiata* que cruzan la ZP y conectan con el oolema, conocidos como uniones tipo *gap* (Gilula *et al.*, 1978). Las células de la granulosa también se interconectan mediante uniones tipo *gap* (Albertini y Anderson, 1974). Este entramado de uniones intercelulares posibilita el intercambio de moléculas entre el ovocito, las células de la granulosa y la circulación sanguínea, con una finalidad nutritiva y reguladora, constituyendo el proceso de “cooperación metabólica” (Canipari, 1994). Las células somáticas proporcionan nucleósidos, aminoácidos y fosfolípidos, además de mantener un balance iónico y una estabilidad en el ARNm en los ovocitos (Hunter, 2000). Esta cooperación es bidireccional, de modo que los ovocitos porcinos secretan un factor de expansión del cúmulus (Nagyova *et al.*, 1997), además de un(os) factor(es) soluble(s) que regula(n) la esteroidogénesis de las células del cúmulus (Coskun *et al.*, 1995), suprime(n) la luteinización y promueve(n) la proliferación de células de la granulosa en cultivo (Brankin *et al.*, 1999). No se han identificado estos factores solubles, aunque entre los candidatos estarían varios factores de crecimiento, incluido el GDF-9.

Los folículos dominantes serán seleccionados de entre los folículos antrales para continuar su crecimiento (Stromstedt y Byskov, 1999). La selección de los folículos que producirán ovocitos maduros listos para ovular en cada ciclo estral está determinada por la expresión de receptores para la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) en sus células de la granulosa (Espey, 1999). Por ejemplo, en los folículos antrales pequeños, cuyas células de la granulosa no poseen receptores para la LH,

la reanudación de la meiosis inducida por esta gonadotropina no se podrá producir; por lo tanto, los folículos seleccionados deberán disponer de estos receptores. Los receptores para la FSH, sólo presentes en la hembra en las células de la granulosa, aumentan de número en la fase de crecimiento (Stromstedt y Byskov, 1999). Al actuar sobre las células de la granulosa, la FSH va a desencadenar la expresión de una batería de genes que codifican factores de crecimiento, enzimas y proteínas involucradas en la esteroidogénesis y péptidos que regulan la liberación de gonadotropinas; los cuales se van a sintetizar y acumular en el fluido folicular (Stromstedt y Byskov, 1999). Además las células de la teca, estimuladas por la LH, van a sintetizar andrógenos que, posteriormente, serán transformados en estradiol por las células de la granulosa (Stromstedt y Byskov, 1999).

Los folículos dominantes tienen un mayor número de receptores para la FSH y son más sensibles a ella que el resto de folículos antrales, por lo que van a producir grandes cantidades de estradiol e inhibina. El estradiol y la inhibina van a regular negativamente la secreción de FSH y, al disminuir su concentración, los folículos menos sensibles a la FSH degeneran, sufriendo el proceso de atresia (Stromstedt y Byskov, 1999).

Justo después del pico preovulatorio de LH, los folículos seleccionados comienzan una rápida expansión como resultado de la acumulación de fluido folicular en el antro. Las altas concentraciones de gonadotropinas en el fluido folicular cambian el patrón de síntesis de esteroides de las células de la granulosa y la teca (Espey, 1999), y preparan al ovocito para la reanudación de la meiosis y la maduración.

2.1.1.3. Maduración del ovocito

La maduración del ovocito, dividida en maduración nuclear y citoplasmática, hace referencia a todos los cambios nucleares, citoplasmáticos y de membrana que sufre el ovocito, con el fin de prepararse para ser fecundado con éxito y desarrollarse posteriormente.

El estímulo que desencadena el inicio de la maduración del ovocito es el aumento preovulatorio en los niveles de gonadotropinas, en especial de LH. Además de la reanudación de la meiosis, el pico de la LH desencadena otras transformaciones dentro del

folículo, como alteraciones en la esteroidogénesis folicular y cambios en el complejo cúmulus-ovocito (COCs) (Moor *et al.*, 1990; Motlik *et al.*, 1986). La respuesta inmediata de las células de la granulosa a la interacción con la LH es la activación de la adenilato ciclasa y la generación de AMPc.

Por tanto, la reanudación de la meiosis viene precedida por un aumento en el AMPc; lo que parece estar en contradicción con su actuación en el manteniendo del bloqueo meiótico en el ovocito. La explicación es que el AMPc desempeña un papel doble en la regulación de la meiosis. Los niveles basales de AMPc producidos por las células somáticas en los folículos antrales pequeños son transferidos de manera continua al ovocito, a través de las uniones tipo *gap*, para mantenerlo en la parada meiótica, pues el ovocito no es capaz de producir AMPc a los niveles necesarios. Sin embargo, a partir de la formación de receptores para la LH en las células del cúmulus y granulosa del grupo de folículos dominantes, éstos pueden responder al pico preovulatorio de la LH produciendo grandes cantidades de AMPc. Las elevadas concentraciones de AMPc en los folículos dominantes median en la acción de la LH sobre la conexina 43, una proteína que forma parte de las uniones tipo *gap* ováricas. Mediante reacciones de fosforilación/defosforilación, se producen cambios en la conformación de la conexina 43 que inducen una inmediata reducción de las comunicaciones intercelulares en dichos folículos y, por tanto, en la cooperación metabólica entre sus células (Gilula *et al.*, 1978; Séller y Schultz, 1980). Este fenómeno, conocido como expansión o mucificación del cúmulus (Eppig, 1979), se produce 16 horas después del pico de gonadotropinas. Bajo esas condiciones, el flujo de AMPc desde las células del cúmulus hacia el ovocito desciende por debajo del umbral requerido para inhibir la activación del factor promotor de la maduración (o de la metafase) (MPF) y el ovocito reanuda la meiosis (Dekel, 1999). Esto explica porqué se produce una reanudación espontánea de la meiosis al extraer los ovocitos de los folículos y cultivarlos *in vitro*, incluso en ausencia de hormonas, como consecuencia del rápido deterioro de la integridad morfológica de las células foliculares (Moor y Crosby, 1987) que conlleva una disminución en el flujo de AMPc hacia el ovocito (Motlik *et al.*, 1986).

La maduración nuclear comienza tras la reanudación de la meiosis. El paso de VG a metafase II (MII) conlleva: la disolución de la membrana nuclear conocida como “rotura de la vesícula germinal”, la formación del huso meiótico y la condensación de la cromatina

en cromosomas homólogos que se alinean en el huso, alcanzando entonces el estadio de metafase I; para continuar con la segregación de los dos grupos de cromosomas homólogos, dando lugar a la extrusión del primer corpúsculo polar (CP) y al paso del ovocito al estadio de MII. La maduración nuclear finaliza cuando el ovocito completa la primera división meiótica con la formación del primer CP, alcanzando el estadio de MII, unas 36-40 horas después del pico de LH (Hunter, 1988), tras lo cual se produce la segunda detención de la meiosis.

El MPF en forma activa es necesario para la rotura de la VG, la condensación de la cromatina, y su actividad alcanza un pico en metafase I y II, para decrecer en anafase I y II (KiKuchi *et al.*, 1995), lo que indica que su inactivación también es necesaria para esta progresión. Por otra parte, la reorganización de los microtúbulos y la apropiada orientación del huso durante la MI parece estar mediada por las MAP kinasas (MAPK), cuya actividad también está inhibida de algún modo por el AMPc y aumenta con la reanudación de la meiosis. A diferencia del MPF, la actividad de las MAPK permanece elevada en los estadios de anafase.

La maduración citoplasmática, en cambio, es un término más amplio que abarca una serie de acontecimientos no directamente relacionados con la progresión de la meiosis pero que preparan al ovocito para la fecundación y el desarrollo embrionario posteriores (Abeydeera, 2002).

En el citoplasma del ovocito se produce una redistribución de las mitocondrias y de los gránulos corticales (GC) (Thibault *et al.*, 1987; Cran, 1985). Tras la rotura de la VG, las mitocondrias migran para situarse en una posición perinuclear durante la maduración (Thibault *et al.*, 1987; Cran, 1985), siendo este movimiento mitocondrial necesario para la progresión de la maduración (Moor *et al.*, 1990). Los GC son un tipo especial de lisosomas primarios, formados a partir del complejo de Golgi y del retículo endoplásmico, compuestos por glicoproteínas y enzimas hidrolíticas. Los GC migran hacia la periferia del ovocito, aumentan de número al final del periodo de maduración (Cran, 1985) y se sitúan debajo de la membrana plasmática formando una monocapa (Crang y Cheng, 1986); circunstancia que será fundamental para el bloqueo de la poliespermia.

Además, la maduración citoplasmática implica una reprogramación de la síntesis proteica. Parte del ARNm que había sido almacenado durante la fase de crecimiento comienza a transcribirse, sintetizándose nuevas proteínas que serán esenciales en la progresión de la meiosis, la regulación de la penetración espermática y la descondensación de la cabeza del espermatozoide (Moor *et al.*, 1990). Entre estas proteínas, el factor de crecimiento del pronúcleo masculino, que será esencial para la formación del pronúcleo masculino tras la penetración del espermatozoide.

2.1.1.4. Ovulación

El pico preovulatorio de LH, inducido por el estradiol producido por los folículos preovulatorios, desencadena finalmente la ovulación (Stromstedt y Byskov, 1999). La LH también estimula la luteinización de las células de la pared de los folículos ovulados, es decir su transformación de productoras de estrógenos a productoras de progesterona, que será la principal hormona esteroidea producida por el cuerpo lúteo tras la ovulación (Geisert, 1999).

En la especie porcina, la ovulación suele tener lugar 30-40 horas después del inicio del estro, tomando el pico preovulatorio de LH como día 0 del ciclo estral, y dura de 1 a 3 horas (Geisert, 1999). Sin embargo, según otros autores (Du Mesnil Du Buisson, *et al.*, 1970) el comienzo de la ovulación es posterior (38-42 h), debido a que tanto el inicio como la duración de la ovulación pueden variar ampliamente (Flowers y Esbenshade, 1993). Los folículos preovulatorios tienen un tamaño de 7 a 11 mm de diámetro y, momentos antes de la ovulación, sus tensas paredes se vuelven pendulantes y flácidas como consecuencia de una disminución de la presión intrafolicular y los complejos cúmulus-ovocito (COCs) se desligan de la pared folicular (Hunter, 1967; Hunter, 1988). El número de ovocitos liberados durante la ovulación es variable, oscilando entre 10 y 24 (Geisert, 1999); y se encuentran en estadio de MII con el primer CP separado y rodeados por las células del cúmulus y por líquido folicular viscoso.

2.1.2. El espermatozoide

En los mamíferos, el espermatozoide es la única célula diseñada para abandonar el organismo y así poder completar su función biológica de unión al ovocito maduro durante la fecundación, formando el cigoto. Muchos de sus rasgos físicos y bioquímicos han evolucionado de modo que se asegure el paso a través del tracto reproductivo masculino y femenino, la protección del ADN de la cabeza espermática durante este tránsito, la penetración de las envolturas del ovocito, y la fusión con la membrana plasmática del ovocito.

Las especiales características presentes en el espermatozoide incluyen: un genoma haploide, un contenido de ADN nuclear altamente condensado y transcripcionalmente inactivo, proteínas nucleares específicas (protaminas en sustitución de las histonas) relacionadas con la compactación de este material genético, un compartimento acrosomal con enzimas hidrolíticas localizado en la parte anterior de la cabeza espermática y de vital importancia en la fecundación, un axonema equipado para proporcionar movilidad con características estructurales no vistas en los flagelos de otras células eucariotas o procariotas, y una membrana plasmática que presenta una polaridad extrema en la distribución de sus proteínas y lípidos (Millette, 1999).

De este modo, el espermatozoide queda estructurado en cabeza y cola. La cabeza, que en el caso del cerdo es de forma oval, contiene el acrosoma y el núcleo; mientras que la cola, dividida en cuello, pieza intermedia y pieza principal, contiene el axonema y una funda de mitocondrias localizada en la porción intermedia rodeando al axonema (Robl y Fissore, 1999).

2.1.2.1. Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso de transformación gradual desde célula germinal hasta espermatozoide y consta de tres fases: proliferación, división reductora (o meiosis) y diferenciación (o espermiógenesis). La espermatogénesis tiene lugar en los túbulos seminíferos de los testículos, cuyo epitelio consta de dos tipos de células: las células germinales y las células somáticas o de Sertoli (Hess, 1999). A diferencia de los ovocitos,

los espermatozoides son producidos a partir de la pubertad y durante el resto de la vida, en la mayoría de los machos (Robl y Fissore, 1999).

En la fase de proliferación, las células germinales masculinas se transforman en espermatogonias por sucesivas divisiones mitóticas. En la fase de meiosis, las espermatogonias sufren dos divisiones meióticas que, como se explicó en el apartado 2.1.1.1, son simétricas y dan lugar a 4 células hijas haploides y genéticamente diferentes, dos de ellas portadoras del cromosoma sexual X y las otras dos del Y, llamadas espermátidas. Finalmente, las espermátidas sufren una fase prolongada de diferenciación, conocida como espermiogénesis, en la que experimentan un conjunto de modificaciones que les llevan a convertirse en una célula altamente especializada, el espermatozoide.

Durante esta metamorfosis celular, los principales cambios estructurales que sufre la espermátida son: elongación del núcleo y condensación de la cromatina, formación del acrosoma a partir del aparato de Golgi, formación de una larga cola que contiene el axonema (formado a partir del complejo centriolar) y mitocondrias en su región intermedia, y pérdida del contenido citoplasmático no necesario (Hess, 1999; Oko y Clermont, 1999). Una vez completado el proceso, los espermatozoides son liberados a la luz del túbulo seminífero (Robl y Fissore, 1999).

2.1.2.2. Maduración final del espermatozoide

2.1.2.2.1. Epidídimo

Los espermatozoides abandonan el testículo y pasan a través del epidídimo hasta el conducto deferente. Los espermatozoides testiculares, aunque ya transformados en células altamente especializadas, no son todavía capaces de fecundar, sino que aún deben experimentar una maduración final, que va a tener lugar durante su transporte a través del epidídimo. A lo largo de su trayecto por el epidídimo, se producen una serie de transformaciones en el espermatozoide que le otorgan la capacidad de interactuar con los gametos femeninos y fecundarlos (Yanagimachi: 1988, 1994). Este proceso se conoce como “maduración epididimaria”.

Uno de los principales cambios que experimenta el espermatozoide es el desarrollo de la capacidad de movimiento progresivo; ya que al abandonar el testículo, los espermatozoides presentan una movilidad nula o muy débil, debido, en parte, a una falta de maduración de su membrana plasmática (Yanagimachi, 1994). Durante la maduración epididimaria, los lípidos de la membrana de los espermatozoides sufren diferentes alteraciones físicas y químicas (Wolf *et al.*, 1988), y se producen cambios en el patrón de distribución de las proteínas intramembranas (glicoproteínas) (Suzuki, 1990). Asimismo, se altera la distribución de los antígenos de la membrana acrosomal externa (Phillips *et al.*, 1991), que podría preparar al espermatozoide para la posterior fusión entre la membrana acrosomal externa y la plasmática que tendrá lugar durante la reacción acrosómica (Yanagimachi, 1994).

El epidídimo presenta un elevado nivel de síntesis de colesterol, que es transferido a la membrana espermática (Suzuki, 1990); por lo que se ha sugerido que el colesterol sea una de las moléculas claves en la alteración de las características de la membrana plasmática de los espermatozoides durante su maduración (Parks y Hammerstedt, 1985). La estabilización de la membrana por el colesterol puede ser beneficiosa para el transporte de los espermatozoides a través de los diferentes, y a menudo hostiles, microambientes dentro del tracto femenino antes de alcanzar al ovocito (Yanagimachi, 1994).

Algunos espermatozoides alcanzan su capacidad fecundante mucho antes (o en una región más proximal del epidídimo) que otros; aunque es en la cola del epidídimo, el principal reservorio de espermatozoides, donde la gran mayoría de ellos adquiere su completa capacidad fecundante (Yanagimachi, 1994). En el cerdo, el transporte de los espermatozoides por el epidídimo dura 10 días, pudiendo permanecer de 4 a 7 días almacenados en la cola del epidídimo antes de ser eyaculados (Geisert, 1999).

2.1.2.2.2. Eyaculación

Durante la eyaculación, los espermatozoides entran en contacto con las secreciones de las glándulas accesorias del aparato genital masculino, que constituyen el plasma seminal. El semen eliminado por la uretra consiste, por tanto, en una suspensión de espermatozoides en plasma seminal.

En este proceso, los espermatozoides entran en contacto con unos factores decapacitantes presentes en el plasma seminal. Estos factores, conocidos como factores de decapitación o estabilizadores del acrosoma, se presentan en el espermatozoide en forma de glicoproteínas de superficie. Los factores estabilizadores del acrosoma evitan la capacitación prematura de los espermatozoides, de modo que éstos no adquieran la capacidad fecundante final mientras migran por el tracto genital femenino, antes de haber llegado al lugar donde se llevará a cabo la fecundación (Töpfer-Petersen *et al.*, 1995).

La eyaculación del verraco se produce en tres fases o fracciones: una fracción preespermática, clara y constituida por plasma seminal libre o pobre en espermatozoides; seguida por una fracción rica o espermática, de apariencia cremosa debido a su elevada concentración espermática; y una fracción pobre o postespermática, de color blanquecino o transparente, compuesta por plasma seminal y una baja concentración de espermatozoides. Durante la eyaculación, sobretudo al final, se secretan unos corpúsculos gelatinosos o “tapioca” procedentes de las glándulas de Cowper, que van a formar un tapón para sellar el cérvix de la hembra, evitando en la monta natural el reflujó del voluminoso eyaculado del verraco (200-300 mL, aproximadamente) (Geisert, 1999).

2.1.3. El oviducto

El oviducto de los mamíferos proporciona el microambiente necesario para la captura, transporte y maduración de los ovocitos ovulados; el transporte, almacenamiento y capacitación de los espermatozoides; la fecundación y; finalmente, las primeras divisiones del embrión (Hunter, 1988). Este microambiente apropiado se debe tanto a las características especiales de la superficie celular del oviducto como al fluido oviductal.

2.1.3.1. Anatomía e histología del oviducto

El oviducto se divide anatómicamente en tres segmentos principales: el infundíbulo, la ampolla y el istmo. El infundíbulo termina en unas fimbrias que conectan con el ovario para facilitar la captura del ovocito en el momento de la ovulación y está

abierto hacia la cavidad peritoneal por el *ostium* tubárico. El istmo conecta con el útero a través de la unión útero tubárica (UUT) (Beck y Boots, 1974).

La arquitectura histológica del oviducto es muy sencilla, con una mucosa no glandular (endosálpinx), cubierta por un epitelio pseudoestratificado de revestimiento compuesto por células ciliadas y no ciliadas (o secretoras); dos capas de músculo liso, una externa longitudinal y una interna circular (miosálpinx); y una cubierta serosa (mesosálpinx) que se continúa con la serosa peritoneal (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1985).

El espesor de las capas mucosa y muscular no es homogéneo a lo largo del oviducto. Mientras que el grosor de la capa muscular interna disminuye hacia la zona del *ostium*, los pliegues longitudinales de la capa mucosa adquieren mayor complejidad, formando incluso pliegues secundarios y terciarios. También varía la proporción de células ciliadas y secretoras a lo largo del oviducto, siendo en las fimbrias y el infundíbulo más abundantes las células ciliadas, y disminuyendo a la vez que se incrementan las células secretoras hacia el istmo (Hafez, 1972; Leese, 1983). Esta especial distribución determina la presencia de compartimentos en la superficie del oviducto con características específicas, que proporcionan el ambiente ideal para soportar los procesos reproductivos que van a tener lugar (Boatman, 1997).

2.1.3.2. Fluido oviductal

El fluido oviductal (FO) está constituido principalmente por una mezcla compleja de sustancias derivadas del plasma sanguíneo, a través de trasudación selectiva, y de proteínas oviductales específicas (Beier, 1974; Harper, 1988; Leese, 1988). El FO está compuesto por proteínas, enzimas, aminoácidos, compuestos energéticos, hormonas y electrolitos (Romar, 2001). La composición del FO varía en las distintas fases del ciclo ovárico. Estas variaciones están controladas por las hormonas ováricas esteroideas (Cox y Leese, 1997). También se observan variaciones en las características fisicoquímicas del FO, tales como el volumen, pH, osmolaridad, etc. Además, la composición y características del FO no son homogéneas en todo el oviducto, sino que varían según la región, constituyendo diferentes microambientes (Biggers y Borland, 1976).

2.1.3.3. Transporte del ovocito

En el momento de la ovulación, el extremo fimbriado del oviducto abraza al ovario, capturando el contenido de los folículos ovulados, es decir, los ovocitos rodeados por un espeso agrupamiento de células del cúmulus (Hunter, 1989) y con una pequeña cantidad de fluido folicular viscoso. Los ovocitos se disponen en la ampolla oviductal, donde se forman agregados entre los COCs. De ahí son transportados hacia el lugar de la fecundación, en la unión ampular ístmica, proceso que dura unos 30-45 minutos (Hunter, 1989).

En el transporte de los ovocitos intervienen las ondas de contracción peristáltica del miosálpinx, el continuo batido hacia el útero de los cilios que revisten la ampolla y los movimientos del mesosálpinx (Hunter, 1989). Durante el transporte de los ovocitos, parece que se produce una maduración final del ovocito secundario debido al cambio de microambiente que experimenta al pasar del folículo al oviducto (Hunter, 1989).

En el oviducto los ovocitos se desnudan, es decir, pierden el revestimiento de células del cúmulus mediante la propia acción mecánica y por la acción enzimática de la hialuronidasa de las cabezas de los espermatozoides (Harper, 1988). Los ovocitos permanecen en el lugar de la fecundación durante 24-48 horas y aquéllos que han sido fecundados pasan al útero en estadio de embriones de 4 células (Harper, 1989), mientras que los no fecundados degeneran en el útero por reblandecimiento y degeneración de la zona pelúcida.

2.1.3.4. Transporte del espermatozoide

El transporte de los espermatozoides a través del tracto genital femenino se divide en tres etapas: 1ª) un rápido transporte transuterino inmediatamente después de la deposición del semen, 2ª) la colonización de un reservorio de espermatozoides en la UUT y en el inicio del istmo (Hunter, 1995), y 3ª) una lenta liberación de espermatozoides desde el reservorio hacia el lugar de la fecundación, en la unión ampular ístmica, en relación con la ovulación (Barrat y Cooke, 1991).

De los miles de millones de espermatozoides depositados en la cerda durante la cubrición o IA, sólo de cien a doscientos mil colonizan el reservorio de la UUT en 1-2 horas (Hunter, 1984). En él, los espermatozoides contactan con los cilios por su región apical (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1990; Mburu *et al.*, 1997), permaneciendo la mayoría de ellos viables (Mburu *et al.*, 1997). La detención de los espermatozoides en el reservorio se ve favorecida por la presencia de una gran cantidad de secreciones mucosas muy viscosas (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1998a), ricas en mucopolisacáridos y glicoproteínas específicas, unido a la reducción de la luz del oviducto en la UUT y el istmo provocada por el edema de la lámina propia (Hunter, 1984). Además, parece que existe una unión selectiva de espermatozoides al epitelio (Mburu *et al.*, 1997), teniendo mayor afinidad aquéllos no capacitados (Fazelli *et al.*, 1999). Mientras los espermatozoides permanecen en el reservorio, se produce una disminución de su metabolismo, y por tanto de su movilidad, debido a las especiales condiciones físico-químicas que se dan en este lugar (Smith, 1998).

Las funciones que va a desempeñar el reservorio espermático son las de: prevenir la poliespermia, gracias a la retención de espermatozoides que evita que un número elevado llegue a la zona de fecundación; y modular la capacitación espermática, mediante un mecanismo de retraso (Smith, 1998). Queda por determinar si el retraso de la capacitación es debido a las secreciones intraluminales y/o a la unión de los espermatozoides a la membrana apical de las células epiteliales del istmo (Murray y Smith, 1997).

2.1.4. Fecundación *in vivo*

2.1.4.1. Capacitación espermática

La capacitación espermática se podría definir como una serie de fenómenos que se producen en los espermatozoides durante el paso de éstos a través del tracto genital femenino, y son: desestabilización de la membrana plasmática, hiperactivación espermática y reacción acrosómica. En el cerdo, el espermatozoide necesita entre 5 y 6 horas en el interior del tracto genital femenino para adquirir la capacidad de penetrar al ovocito (Polge, 1978).

Las tasas de capacitación *in vivo* son menores antes que después de la ovulación (Smith y Yanagimachi, 1989) y varían según el segmento oviductal (Hunter *et al.*, 1998). Los glicosaminoglicanos (GAGs) presentes en el fluido oviductal, como la heparina o el ácido hialurónico, estimulan la capacitación espermática de un modo dosis-dependiente (Lee *et al.*, 1985). Los niveles de GAGs varían durante el ciclo sexual de la hembra (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1998a), aumentando de manera significativa desde el final del proestro y siendo máximos durante la fase preovulatoria del estro, para disminuir posteriormente.

Este incremento en los niveles de GAGs previo a la ovulación causa la disociación de glicoproteínas de superficie del espermatozoide (Oliphant y Eng, 1981), entre ellas la de los factores de decapitación o estabilizadores del acrosoma adquiridos durante la eyaculación. La pérdida de dichos factores induce unos fenómenos de reorganización y modificación de moléculas de la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide, que incluyen la eliminación de colesterol y de proteínas epididimales y del plasma seminal (Harrison, 1996; Visconti *et al.*, 1999), y la difusión lipídica (Wolfe *et al.*, 1998) con aparición de fosfolípidos fusigénicos en la región acrosomal (Snider y Clegg, 1975).

Todo ello va a dar lugar a una modulación de la fluidez de la membrana espermática, con aparición de zonas de alta fluidez pobres en proteínas; y a una serie de cambios en la permeabilidad iónica de la misma, ocasionando un aumento del pH intracelular. Esta alcalinización intracitoplasmática provoca la apertura de los canales de Ca^{2+} y la consiguiente entrada masiva de este catión (Töpfer-Petersen *et al.*, 2000), que va a ser esencial para el inicio de la reacción acrosómica.

2.1.4.1.1. Hiperactivación espermática

La capacitación va asociada a cambios en los patrones de movilidad del espermatozoide (hiperactivación). DeMott y Suarez (1991, 1992) observaron en el ratón que la hiperactivación facilitaba la liberación de los espermatozoides retenidos en los reservorios de su unión al epitelio oviductal y el desplazamiento a través del medio viscoso presente en la luz del istmo. En porcino, del total de espermatozoides presentes en el reservorio, sólo unos pocos miles alcanzan la región inicial del istmo y, finalmente sólo un

pequeño número llega al lugar de la fecundación (Mburu *et al.*, 1997), minimizando de este modo la poliespermia (Hunter, 1991) y asegurando un número adecuado de espermatozoides fértiles en el lugar y momento de la fecundación.

2.1.4.1.2. Paso del espermatozoide a través del cúmulus

Los ovocitos recién ovulados están rodeados por unas cubiertas, la zona pelúcida (ZP) y el cúmulus, que el espermatozoide debe atravesar antes de penetrar al ovocito. El cúmulus, que recubre a la ZP, está presente en el momento de la fecundación en la mayoría de mamíferos (a excepción de algunos ungulados como la oveja y la vaca) (Hunter, 1988). Está constituido por las células del cúmulus y por una matriz extracelular, cuyo principal componente es el ácido hialurónico que se inserta a la ZP por su región fenestrada exterior (Talbot y DiCarlantonio, 1984).

Los espermatozoides deben estar capacitados y con el acrosoma intacto para atravesar el cúmulus, pues se ha observado en varias especies (Austin, 1960; Myles y Primakoff, 1997) que aquéllos no capacitados y los que ya han sufrido la reacción acrosómica, aunque pueden unirse a la superficie de las células del cúmulus, no pueden atravesarlo. Este hecho es contradictorio con la creencia inicial que suponía que el espermatozoide utilizaría las enzimas hidrolíticas de su acrosoma, liberadas tras la reacción acrosómica, para digerir el ácido hialurónico de la matriz extracelular del cúmulus.

Recientemente se ha estudiado una proteína de superficie del espermatozoide, denominada PH-20 (Myles y Primakoff, 1997); la cual, gracias a su actividad hialuronidasa es capaz de hidrolizar el ácido hialurónico y permitir al espermatozoide atravesar la densa capa de células del cúmulus, ayudado por su movimiento hiperactivo. Además, se ha observado *in vitro* que las células expandidas del cúmulus de ovocitos maduros mejoran la movilidad del espermatozoide (Wang *et al.*, 1994). Así se explica cómo los espermatozoides capacitados y con el acrosoma intacto son capaces de atravesar el cúmulus.

2.1.4.1.3. Unión a la zona pelúcida: unión primaria y secundaria

La zona pelúcida (ZP) está presente en los ovocitos de todos los mamíferos en el momento de la fecundación y va a desempeñar unas funciones básicas en dicho proceso, tales como la unión del espermatozoide (Sacco *et al.*, 1984), la inducción de la reacción acrosómica (Berger *et al.*, 1989), el bloqueo de la poliespermia (Braden *et al.*, 1954) y la protección frente a fecundaciones interespecíficas (Stromstedt y Byskov, 1999); además de desempeñar una función protectora del ovocito y del embrión temprano (Stromstedt y Byskov, 1999).

La ZP es una cubierta glicoproteica, espesa y elástica, que rodea al ovocito. En la ZP porcina se han identificado cuatro familias de glicoproteínas: ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4, con distintos pesos moleculares (Sacco *et al.*, 1986) y diferente distribución (Hedrick y Wardrip, 1982). Estas glicoproteínas están altamente glicosiladas, lo que es muy importante para conferirle a la ZP sus funciones biológicas específicas (Kopf, 1999). La composición y las características de la ZP parecen ser muy diferentes *in vivo* e *in vitro* (Romar, 2001), lo cual podría influir en la eficacia de la FIV.

Se ha observado que, tras la ovulación, la composición de la ZP se modifica por la adición de unas proteínas sintetizadas por el epitelio oviductal, conocidas como “oviductinas” (Robitalle *et al.*, 1988). La síntesis y secreción de algunas de ellas está controlada hormonalmente, siendo específicas de distintas fases del ciclo estral (Buhi *et al.*, 1989). Buhi *et al.* (1993) identificaron 3 glicoproteínas estrógeno-dependientes en la ZP, el espacio perivitelino y la membrana plasmática de los ovocitos porcinos. La adhesión a la ZP de estas oviductinas podría modificar los sitios de unión del espermatozoide, influyendo en el reconocimiento e unión de los gametos masculino y femenino.

Antes de atravesarla, el espermatozoide se ha de unir a la ZP del ovocito, unión mediada por la interacción entre moléculas con gran afinidad presentes en la superficie de ambos gametos. Los espermatozoides que no son capaces de reconocer y unirse a las glicoproteínas de la ZP o responder a la ZP sufriendo la reacción acrosómica no fecundarán al ovocito (Töpfer-Petersen *et al.*, 2000). En la unión primaria del

espermatozoide a la ZP, anterior a la reacción acrosómica (RA), está involucrada la glicoproteína espermática ZP3; mientras que en la unión secundaria, que acontece tras la RA, intervienen la glicoproteína ZP2 y la proteína PH-20 (Bleil y Wassarman, 1983; Myles y Primakoff, 1997). El papel que tiene la unión secundaria dentro del proceso de la fecundación es desconocido (Myles y Primakoff, 1997) y, hasta la fecha, parece ser que el papel que desempeña la ZP1 es solamente estructural (Kopf, 1999).

2.1.4.1.4. Reacción acrosómica

En los mamíferos, los espermatozoides deben experimentar la reacción acrosómica (RA) para atravesar la ZP del ovocito (Yanagimachi, 1981). El acrosoma es un gránulo de gran tamaño que contiene enzimas en forma de zimógeno, fundamentalmente hialuronidasa, y que se encuentra situado en la región apical de la cabeza del espermatozoide, bajo su membrana plasmática.

Se ha comprobado que el cúmulus expandido (Mattioli *et al.*, 1998) y la ZP (Berger *et al.*, 1989) de los ovocitos porcinos contienen algunos factores capaces de inducir la RA en los espermatozoides capacitados de verraco. Recientemente, se ha demostrado que la ZP del ratón estimula el aumento en la actividad de la adenilato ciclasa del espermatozoide, dando lugar a un aumento en la concentración intracelular del AMPc (Kopf, 1999). Esta elevación del AMPc precede a la RA, lo que sugiere que el AMPc pueda estar involucrado en la ruta de señales que lleva a la exocitosis del contenido acrosomal. Se sabe que el AMPc está implicado en reacciones de fosforilación de proteínas espermáticas, en las que se está investigando para desvelar su papel dentro de la funcionalidad espermática (Bedford y Cross, 1999).

Durante la RA, y como consecuencia de los procesos desestabilizadores de las membranas que provoca la capacitación, se produce en el espermatozoide un aumento intracelular de Ca^{2+} . Este aumento de calcio desencadena múltiples fusiones entre las membranas plasmática y acrosomal externa del espermatozoide, que probablemente tienen lugar en las zonas de alta fluidez (Ahkong *et al.*, 1975), pobres en proteínas. Al fusionarse, se originan unas vesículas que se desprenden de la cabeza espermática y, de este modo, se

provoca la liberación y dispersión del contenido del acrosoma (Langlais y Roberts, 1985). Además, los fosfolípidos fusigénicos de la región acrosomal van a sufrir una hidrólisis, en presencia de la fosfolipasa A₂, dando lugar a lisofosfolípidos y ácidos grasos libres que, al desestabilizar las membranas, favorecen su fusión (Nikolopoulou *et al.*, 1986).

2.1.4.1.5. Penetración de la zona pelúcida y fusión de membranas

Tras la RA y la unión secundaria a la ZP, el espermatozoide atraviesa el espesor de la ZP para alcanzar el espacio perivitelino. Según la hipótesis propuesta por O'Rand *et al.* (1986), la penetración de la ZP se conseguiría mediante la acción coordinada de las enzimas acrosomales liberadas en la RA y la potente fuerza de empuje desarrollada por el movimiento del espermatozoide, que agita la cola de lado a lado y la cabeza de delante a atrás.

Una vez en el espacio perivitelino, la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide localizada sobre el segmento ecuatorial se une a la membrana plasmática del ovocito, y se inicia en ese punto la fusión de ambas membranas (Moore y Bedford, 1983). En el proceso de fusión está implicada una proteína presente en la membrana plasmática del espermatozoide, la fertilina (Myles y Primakoff, 1997). La entrada de la cabeza del espermatozoide en el citoplasma del ovocito va acompañada de la incorporación gradual de su cola (Gaddum-Rosse, 1985). Las mitocondrias presentes en la cola del espermatozoide son degradadas y sólo las mitocondrias maternas pasarán a la siguiente generación. La fusión de membranas desencadena la activación del ovocito (Yanagimachi, 1994).

2.1.4.2. Activación del ovocito

El ovocito, metabólicamente inactivo, experimenta tras la fusión con el espermatozoide un “despertar” que, mediante una serie de cambios morfológicos y bioquímicos, le va a conducir a la diferenciación y formación de un nuevo individuo. Este despertar del ovocito se conoce como activación (Yanagimachi, 1988). Los dos

indicadores más claros de la activación del ovocito son la exocitosis de los gránulos corticales y la reanudación de la meiosis.

La fusión de membranas del espermatozoide y el ovocito provoca una liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracitoplasmáticos (como el retículo endoplásmico), que da lugar a un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} en el ovocito penetrado en forma de oscilaciones repetitivas. Parece ser que el factor que induce estos ciclos de elevaciones de Ca^{2+} intracelular es una proteína soluble espermática, llamada oscilógeno, que entra en el citoplasma del ovocito tras la fusión (Hunter, 1999).

Este aumento intracelular de Ca^{2+} , conocido como “detonación del Ca^{2+} ” (Jaffe, 1985), parece ser la primera señal que dispara el mecanismo de activación del ovocito. Leese *et al.* (1984) han observado que tras la activación de ovocitos de ratón se produce un brusco aumento de la concentración intracelular de ADP (adenosil difosfato), que libera al ovocito de su estado respiratorio y metabólico disminuido. Los ovocitos de mamíferos no precisan de la penetración espermática para experimentar su activación, pues también pueden ser activados por una gran variedad de estímulos físicos y químicos (Whittingham, 1980).

2.1.4.2.1. Reacción cortical

La activación del ovocito da lugar a la liberación hacia el espacio perivitelino del contenido de los gránulos corticales (GC), situados al final del periodo de maduración en posición periférica bajo la membrana plasmática del ovocito. Las enzimas hidrolíticas y glicoproteínas liberadas modifican las características fisicoquímicas de la ZP de manera que se impide la entrada de nuevos espermatozoides y, por tanto, la poliespermia. Este proceso se conoce como reacción cortical o de zona (Yanagimachi, 1988). Por ejemplo, en el ratón (Wassarman, 1987) la exocitosis de los GC provoca la inactivación por hidrólisis de la glicoproteína ZP3 (responsable de la unión primaria a la ZP y de la inducción de la RA del espermatozoide), estableciendo de este modo la reacción cortical en esta especie.

Aunque la exocitosis de la mayoría de los GC se produce de forma explosiva tras la fusión de membranas, algunos son liberados mientras el ovocito se encuentra en el folículo

ovárico y una vez maduro antes de ser fecundado (Okada *et al.*, 1986). Según Okada *et al.* (1986) esta excitosis prematura de los GC podría contribuir, por una parte, a la formación del espacio perivitelino, que permitiría el libre movimiento del espermatozoide una vez atraviesa la ZP, favoreciendo su fusión con la membrana del ovocito; y por otra, a la modificación de las características fisicoquímicas de la ZP y de la membrana plasmática del ovocito, de modo que sólo un espermatozoide con un movimiento vigoroso pudiera penetrarlo. Tras la fecundación, los GC desaparecen del ovocito (Wang *et al.*, 1997b).

2.1.4.2.2. Reanudación de la meiosis

La fusión con el espermatozoide desencadena en el ovocito su activación nuclear, a través del aumento intracelular de Ca^{2+} . El ovocito, que antes de la fecundación había quedado detenido en estadio de metafase de la segunda meiosis, reanuda la meiosis dando lugar a la extrusión del segundo CP.

2.1.4.3. Formación del pronúcleo masculino y femenino

Una vez dentro del ovocito, la membrana nuclear del espermatozoide se rompe, se produce la sustitución de protaminas por histonas, la cromatina descondensa y se forma una nueva membrana nuclear, dando lugar al pronúcleo masculino (PNM). Por otra parte y tras la extrusión del segundo CP, el genoma haploide materno restante también descondensa, se forma la membrana nuclear y queda constituido el pronúcleo femenino. La síntesis de ADN comienza simultáneamente en los dos pronúcleos masculino y femenino.

El factor que controla la formación del PNM se conoce como factor de crecimiento del pronúcleo masculino (Thibault y Gerard, 1973), y aparece en el ovocito durante la fase final de su maduración (Ding *et al.*, 1992b). En la mayoría de las especies, el ovocito contiene unos factores citoplasmáticos que reaccionan con la cromatina espermática, induciendo cambios moleculares que incluyen: la rotura de puentes disulfuro, la degradación enzimática parcial de proteínas nucleares, la liberación de las protaminas asociadas a la cromatina y su inmediata sustitución por histonas procedentes del ovocito (Zirkin *et al.*, 1989). Entre estos factores citoplasmáticos destaca el glutatión.

El glutatión (GSH) es el principal compuesto sulfidrilo no proteico presente en las células mamíferas y tiene múltiples acciones, incluyendo un efecto en el transporte de aminoácidos, síntesis de ADN y proteínas, reducción de los puentes disulfuro, y una acción antioxidante que protege a las células contra el daño oxidativo (Meister, 1983; Meister y Tate, 1976; Meister y Anderson, 1983). Se sabe que la síntesis de GSH durante la maduración de los ovocitos es un prerrequisito para que se produzca la descondensación de la cromatina del espermatozoide penetrado y, por tanto, para que se consiga la formación del PNM (Perreault *et al.*, 1988); pues el GSH reduce de los puentes disulfuro (S-S) de la protamina del núcleo espermático, promoviendo su rotura (Nagai, 1996).

2.1.4.4. Fusión de los pronúcleos y formación del cigoto

Una vez completamente formados, los pronúcleos masculino y femenino migran hacia el centro del citoplasma, se aproximan el uno al otro hasta quedar frente a frente, se desintegran sus membranas nucleares y sus cromosomas se asocian antes de efectuar la primera división mitótica. La unión o fusión de los pronúcleos masculino y femenino se considera el fin del proceso de fecundación y el inicio del desarrollo embrionario (Yanagimachi, 1988), y en los mamíferos este proceso dura aproximadamente 12 horas.

2.1.4.5. Mecanismos fisiológicos de prevención frente a la poliespermia

La penetración poliespérmica, es decir la entrada en el citoplasma del ovocito de más de un espermatozoide, es un fenómeno anómalo en los mamíferos (Beatty, 1957), dando lugar a embriones poliploides que normalmente mueren en un estadio temprano de desarrollo. La poliespermia en condiciones *in vivo* es debida, principalmente, a la llegada a la superficie del ovocito porcino de un número anormalmente elevado de espermatozoides competentes, de una manera más o menos simultánea; o también al envejecimiento del ovocito.

Como hemos visto, los mamíferos disponen de una serie de mecanismos de defensa que evitan la poliespermia. Se produce un brusco descenso en el número de espermatozoides entre los que son depositados en la hembra y los que finalmente llegan al lugar de fecundación. Los espermatozoides que no consiguen alcanzar su objetivo quedan

retenidos tanto en su trayecto a lo largo del útero, como en los reservorios de la unión ampular ístmica. En los reservorios, los espermatozoides viables son liberados de una manera gradual y en un número reducido momentos antes de la ovulación. La proporción de espermatozoides/ovocito en el inicio de la fecundación está próxima a 1:1 (Hunter, 1993). Además, los ovocitos disponen de una serie de estrategias que reducen la posibilidad de que dos o más espermatozoides competentes lleguen simultáneamente a su membrana plasmática (Hunter, 1999). Éstas son, por una parte las capas de células del cúmulus que rodean al ovocito al ser ovulado, y por otra, el establecimiento de la reacción cortical en la ZP, que es el mecanismo más específico de bloqueo de la poliespermia.

En algunas especies, como la rata, el ratón, el cobaya y el gato, el bloqueo de la poliespermia se produce en la membrana plasmática más que en la ZP, permitiendo que un número considerable de espermatozoides se acumule en el espacio perivitelino (Austin, 1961). De hecho, cada vez hay una mayor certeza de la existencia de un bloqueo suplementario al de la ZP en la membrana plasmática en especies en las que clásicamente se había supuesto que disponían de un fuerte bloqueo de zona, como el hombre y el cerdo.

Además de evitar la polispermia, estos mecanismos ejercen una función selectiva de los espermatozoides; pues la composición espermática del eyaculado es muy heterogénea respecto a edad celular, morfología, movilidad y capacidad para sufrir la reacción acrosómica.

2.1.5. Desarrollo embrionario preimplantacional

2.1.5.1. Vínculos materno-embrionarios

Durante los primeros estadios de la gestación, las interacciones materno-embrionarias en porcino tienen una gran importancia, ya que en esta especie, como en otros ungulados domésticos, el periodo preimplantacional es bastante prolongado. La importancia de esta estrecha relación entre el desarrollo embrionario y el ambiente uterino queda patente en la sincronía necesaria entre el estadio del embrión y del útero en las transferencia de embriones.

2.1.5.2. Periodo pre-eclosión

2.1.5.2.1. División embrionaria

Como ya hemos visto, la fecundación tiene lugar en el oviducto, en la unión ampular ístmica. La primera división se produce de 17 a 19 horas tras la ovulación (Hunter, 1974). Los embriones se mantienen en el estadio de 2 células sólo de 6 a 8 horas; sin embargo el estadio de 4 células se prolonga durante 20-24 horas (Flint, 1981), por lo que la mayoría de los embriones entran en el útero en este estadio (Harper, 1988; Davis, 1985). Según Hunter (1974), los embriones y los ovocitos no fecundados pasan al útero 46-48 horas tras la ovulación, aunque esta entrada se puede prolongar hasta 3 días después de la ovulación.

Tras ese periodo de 2 días en el que los embriones son retenidos en el oviducto, las concentraciones crecientes de progesterona van a causar la dilatación del oviducto y, como resultado, el paso de los embriones hacia el útero (Dziuk, 1985). La retención de los embriones en el oviducto permite que el ambiente uterino sufra una serie de modificaciones, tales como el paso de granulocitos polimorfonucleares a través del epitelio uterino durante el estro (Stroband *et al.*, 1986). El oviducto secreta sustancias que podrían modificar la composición de la ZP (Hedrick *et al.*, 1987), y además afectar a la tasa de división (Fukui *et al.*, 1988) o a la viabilidad embrionaria (Gandolfi y Moor, 1987). Asimismo, el ambiente oviductal también provoca una demora en la digestión enzimática de la ZP de los embriones e influencia su función de barrera selectiva (Broemann *et al.*, 1988).

El útero va a ser el compartimento en el que se desarrollarán los embriones porcinos desde el estadio de 4 células hasta el nacimiento (Stroband y Van der Lende, 1990). La pared uterina está constituida por la serosa, el miometrio y el endometrio; y este último está formado por una túnica propia y dos tejidos epiteliales: el epitelio luminal y las glándulas, que reposan sobre la túnica propia (Stroband y Van der Lende, 1990). El útero no es un simple saco en el que los embriones flotan más o menos libres, sino que su pared está plegada de tal modo que los pliegues opuestos se entrelazan y la luz uterina queda reducida a un espacio angosto. Las células epiteliales del útero sufren cambios en su altura

a lo largo del ciclo estral (Sidler *et al.*, 1986), al igual que también se ven modificados los pliegues de la pared (Sidler *et al.*, 1986).

Por otra parte, es posible que los embriones también cambien su propio microambiente uterino al liberar hacia el útero esteroides, que se encuentran a altas concentraciones en los embriones tempranos, los cuales actuarían sobre la permeabilidad vascular local y la liberación de proteínas endometriales; ya que la síntesis y secreción de proteínas uterinas está modulada por el estrógeno y la progesterona (Simmen *et al.*, 1988). El concepto de que los embriones no están flotando en un ancho lumen uterino, sino que se encuentran en un espacio limitado entre los pliegues de la pared da más credibilidad a las consideraciones sobre el potencial de los embriones jóvenes de cambiar su propio microambiente uterino.

El epitelio y endotelio endometrial funcionan como una barrera de intercambio selectivo entre la circulación sanguínea y la luz uterina (McRae, 1988). Además, el fluido uterino de los mamíferos, incluido el cerdo, parece ser que contiene factores estimulantes e inhibidores de la síntesis de ADN embrionaria (Flint, 1981). En un estudio realizado en ovino, en el que se transfirieron asincrónicamente embriones, aquéllos que estaban retrasados en relación con el útero se desarrollaron más rápido, mientras que los que estaban adelantados respecto al estadio uterino lo hicieron más lentamente (Wilmot *et al.*, 1985), lo que indica la importancia del ambiente uterino. Parece ser que el ambiente uterino cambiante va a influir en el desarrollo embrionario y la viabilidad de los embriones.

El estadio de mórula de 8-16 células se alcanza alrededor del día 4, tomando el momento de la ovulación como día 0 (Stroband y Van der Lende, 1990). Durante el proceso de división, las organelas citoplasmáticas son escasas y están concentradas alrededor del núcleo, mientras que las inclusiones de vitelo llenan las zonas periféricas del citoplasma. Las mitocondrias, que son globulares durante los primeros estadios de división, se elongan en el estadio de mórula, lo que sugiere un incremento en su actividad metabólica. Los nucleolos se observan a partir de las 8 células y su desarrollo se acompaña de un incremento en el número de ribosomas.

Todo ello indica la activación del genoma embrionario, es decir, el punto a partir del cual el genoma embrionario comienza a ser transcripcionalmente activo y pasa a ser el que controla el desarrollo del embrión (Exley y Carol, 1999); y corresponde en el cerdo al inicio de la síntesis de ARN en el estadio de 4 células (Freitag *et al.*, 1988). Antes de esta activación genómica, el desarrollo embrionario está controlado por proteínas y ARN maternos, sintetizados y almacenados en forma inactiva por el ovocito (Exley y Carol, 1999). El bloqueo en el estadio de 4 célula, que supone un obstáculo para el cultivo *in vitro*, corresponde al momento de la activación del genoma embrionario, y es análogo al que sufren los embriones ovinos en 8-16 células o los bovinos en 8 células.

2.1.5.2.2. Formación del blastocisto

A partir del estadio de mórula compactada, los blastómeros internos se diferenciarán en la masa celular interna, que a su vez dará lugar al futuro embrión verdadero; mientras que los blastómeros externos se transformarán en el trofoblasto, que será el origen de parte de los anejos embrionarios y que participará especialmente en la formación de la placenta (Johnson, 1981).

Durante el proceso de compactación, los blastómeros exteriores forman una capa de células polarizadas en estrecho contacto (Dulcibella, 1977). Más tarde se forman entre estas células vecinas unos complejos de unión, que incluyen uniones herméticas y desmosomas, y a partir de aquí el trofoblasto queda formado (Borland, 1977; McLaren y Smith, 1977). Las células del trofoblasto tienen permeabilidad selectiva, lo cual va a favorecer el transporte de sodio y agua que contribuirá a la formación del blastocele (Borland, 1977); momento a partir del cual el embrión alcanza el estadio de blastocisto. Los blastómeros internos, sin embargo, se diferenciarán más tarde.

En el cerdo las primeras señales de compactación se observan en el día 4, en el estadio de 8 células (Hunter, 1974), la diferenciación entre las células o blastómeros interiores y exteriores comienza a partir de las 12-16 células en adelante y los primeros complejos de unión aparecen en el estadio de mórula compactada alrededor del día 5 (Barends *et al.*, 1989). El estadio de blastocisto se alcanza en el día 5-6 y el número de

células en el momento de la formación del blastocele es normalmente de 16-32 (Papaioannou y Ebert, 1988).

Durante la formación del blastocele, las células del trofoblasto están bien desarrolladas y polarizadas, contienen un número creciente de mitocondrias y algunas hebras de retículo endoplásmico y aparato de Golgi, y presentan numerosas microvellosidades orientadas hacia la luz uterina; mientras que las células de la masa celular interna presentan formas desiguales, no muestran polaridad y sus organelas apenas están desarrolladas. Sin embargo, ambos tipos celulares contienen grandes glóbulos de vitelo y algunas gotas lipídicas en este estadio.

Antes de la eclosión, los blastocistos sufren un fenómeno de expansión, de modo que ocupan por completo el espacio perivitelino. La media de células en los blastocistos porcinos expandidos es de 65-120. La proporción de células que constituyen la masa celular interna en este estadio es como máximo del 25% del total de células del embrión (Papaioannou y Ebert, 1988).

2.1.5.3. Eclosión y periodo post-eclosión

Hasta el momento de la eclosión, la ZP desempeña una importante función en la regulación osmótica (Bronson y McLaren, 1970), la contención de los blastómeros en el embrión (Modlinski, 1970) y la mejora de la supervivencia del ovocito y el embrión en el oviducto y en el útero (Dumont y Brummett, 1985). La rotura de la ZP en los embriones porcinos se produce en el día 6-7, y este proceso parece ser independiente del número de células del blastocisto, al menos en estudios realizados *in vitro* (Niemann *et al.*, 1983).

No se conocen con exactitud los factores que causan la lisis de la ZP, pero podrían estar involucrados fenómenos mecánicos, enzimas embrionarias o factores uterinos. En el momento de la eclosión, los blastocistos porcinos contienen prostaglandina E (Stone *et al.*, 1986), que podría estar implicada en la regulación del transporte de agua. Este efecto mecánico del agua, como ocurre en los embriones bovinos (Betteridge y Flechon, 1988), podría colaborar en la rotura de la ZP, previa a la eclosión del blastocisto.

Tras la eclosión, los blastocistos porcinos permanecen en la luz del útero hasta el día 13 (Dantzer, 1985), lo que constituye un periodo preimplantacional muy largo si se le compara con el de los humanos o los animales de laboratorio. El diámetro de los blastocistos recién eclosionados es de 0.2 mm aproximadamente.

Entre la eclosión y la implantación, el desarrollo embrionario es peor soportado por los sistemas *in vitro* que en estadios más tempranos. Por ejemplo, la elongación y expansión de los blastocistos eclosionados, al ser dependiente de factores uterinos, no tiene lugar *in vitro*. Hay, por lo tanto, una palpable evidencia de la interrelación entre los embriones y el útero durante este periodo posterior a la eclosión. Pero no nos vamos a extender más en este estadio, pues el desarrollo embrionario *in vitro* se da por concluido tras la eclosión de los blastocistos.

2.2. PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES PORCINOS

La fecundación *in vitro* (FIV) se ha definido como la unión o cocultivo de espermatozoides capacitados y ovocitos maduros de forma que la penetración espermática ocurra fuera del tracto genital femenino (Martínez *et al.*, 1989). La producción *in vitro* de embriones (PIV) es un proceso más amplio que comprende: la obtención y maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos, la capacitación *in vitro* de los espermatozoides, el cocultivo de ambos gametos o FIV, y el cultivo *in vitro* de los embriones resultantes (CE) hasta alcanzar el estadio de blastocisto.

En 1974, Motlik y Fulka (1974) consiguieron fecundar *in vivo* ovocitos porcinos que habían sido madurados *in vitro* y, cuatro años más tarde, Iritani *et al.* (1978) lograron la primera MIV-FIV en porcino, utilizando espermatozoides incubados en tractos reproductivos aislados de hembras. Nagai *et al.* (1984) fueron los primeros en capacitar *in vitro* espermatozoides porcinos con éxito. Un año después, Cheng (1985) obtuvo el nacimiento de crías a partir de ovocitos porcinos madurados *in vivo* y fecundados *in vitro* y, finalmente, Mattioli *et al.* (1989) lograron producir lechones a partir de ovocitos MIV y FIV. Sin embargo, en aquel momento el CE de los embriones porcinos sólo se podía llevar

a cabo durante un corto periodo de tiempo previo a la transferencia a hembras receptoras. Por fin, Petter y Wells (1993) y Beckmann y Day (1993) consiguieron cultivar *in vitro* embriones de cerdo hasta el estadio de blastocisto, superando así el bloqueo en cuatro células.

Aunque se han hecho grandes progresos en el desarrollo de las técnicas de MIV, FIV y CE, aún son necesarias nuevas mejoras para maximizar la producción de embriones. En un principio, a pesar de lograrse con éxito la maduración nuclear de los ovocitos, los científicos se enfrentaban a dos problemas importantes: la baja formación de pronúcleo masculino (PNM) y la alta incidencia de fecundaciones poliespérmicas (Funahashi y Day, 1996, 1997; Niwa, 1993; Sirard *et al.*, 1993; Nagai, 1994; Abeydeera, 2001). Con ello, quedó de manifiesto que las condiciones de maduración no eran las adecuadas y debían ser modificadas, pues la obtención de embriones viables requiere lograr no sólo la maduración nuclear de los ovocitos, sino también una completa maduración citoplasmática.

Las modificaciones realizadas en las condiciones iniciales de MIV (Day *et al.*, 2000a; Abeydeera, 2002; Nagai, 2001) han mejorado la maduración citoplasmática de los ovocitos, solventado el problema de la baja formación de PNM. Sin embargo, la poliespermia, el principal problema dentro de la PIV de embriones porcinos, sigue sin resolverse y aún no se ha podido determinar si se debe a condiciones subóptimas de cultivo durante la MIV, la FIV o ambas. En la actualidad, el desarrollo hasta el estadio de blastocisto de los embriones PIV es todavía bajo y la calidad los blastocistos obtenidos tras el CE es menor que la de los producidos *in vivo*. Los resultados actuales de la MIV/FIV/CE oscilan, según los diferentes protocolos y grupos de trabajo, entre los siguientes valores: maduración nuclear: de 70% a 95%; penetración: de 50% a 90%; formación de PNM: de 80% a 91%; poliespermia: de 5% a 91%; división embrionaria: de 20% a 75%; y desarrollo hasta blastocistos: de 2% a 36% (Niemann y Rath, 2001).

A pesar de todo ello, a lo largo de la última década la PIV de embriones porcinos ha experimentado importantes avances, obteniéndose aceptables tasas de gestación y de tamaño de camada tras las transferencias embrionarias realizadas con embriones producidos *in vitro*. Hay que remarcar que estas mejoras suponen un importante triunfo, dado el pobre conocimiento actual de los mecanismos que regulan la maduración y

fecundación de los ovocitos y el desarrollo embrionario. De la misma manera, es de esperar que el desarrollo de nuevas técnicas y la optimización de las existentes de lugar a nuevos progresos en este campo.

2.2.1. Maduración *in vitro*

El proceso de maduración del ovocito se suele dividir en maduración nuclear y citoplasmática. El ovocito maduro a nivel nuclear puede ser claramente identificado como aquél que reanuda la meiosis y alcanza el estadio de MII; mientras que la maduración citoplasmática, término que abarca una serie de acontecimientos no directamente relacionados con la progresión de la meiosis pero que van a preparar al ovocito para la fecundación y el desarrollo embrionario posteriores (Abeydeera, 2002), se ha de estimar de un modo indirecto.

Los parámetros empleados por la mayoría de los científicos para determinar el grado de maduración citoplasmática del ovocito son la capacidad de formación de PNM (Mattioli *et al.*, 1988a; Naito *et al.*, 1988; Funahashi y Day, 1993c; Funahashi *et al.*, 1994a, 1996a; Wang y Niwa, 1995; Wang *et al.*, 1997a; Ka *et al.*, 1997) y el contenido intracelular de glutatión (GSH) (Abeydeera *et al.*, 1998b; Funahashi *et al.*, 1996a). Además, se han utilizado otros indicadores de la maduración citoplasmática, como la exocitosis del contenido de los gránulos corticales al espacio perivitelino (Wang *et al.*, 1997a) y el desarrollo embrionario temprano tras la FIV (Funahashi *et al.*, 1994c; Abeydeera *et al.*, 1998b).

Como hemos visto en el apartado 2.1.4.3, el ovocito que no ha completado su maduración citoplasmática no es capaz de reaccionar de manera correcta con la cromatina del espermatozoide penetrado e inducir los cambios moleculares necesarios para la formación del PNM, pues este proceso está controlado por el factor de crecimiento del pronúcleo masculino, que se sintetiza durante la fase final de la maduración del ovocito. El GSH, sintetizado también durante la maduración del ovocito, es un factor citoplasmático necesario para la descondensación de la cromatina espermática y, por tanto, para la formación del PNM (Perreault *et al.*, 1988; Yoshida, 1993).

Esto explica la estrecha relación que existe en el porcino entre la maduración citoplasmática y la formación del PNM (Moor *et al.*, 1990); y por esta razón, tanto el porcentaje de formación de PNM como el contenido intracelular de GSH de los ovocitos (Day *et al.*, 2000a) pueden ser tomados como indicadores de la maduración citoplasmática del ovocito. Asimismo, se ha demostrado una alta correlación entre el contenido de GSH del ovocito al final de la MIV y la incidencia de formación de PNM tras la FIV (Funahashi *et al.*, 1994b). Al mismo tiempo, el GSH está involucrado en la protección del ovocito contra el fenómeno de apoptosis, inducido por la presión oxidativa generada bajo las condiciones de cultivo *in vitro* (Tatemoto *et al.*, 2000).

El fallo en la maduración citoplasmática de los ovocitos MIV puede deberse a deficiencias inherentes a los propios ovocitos y/o condiciones subóptimas de cultivo (Abeydeera, 2002). Para resolverlo es preciso realizar una buena selección y manipulación de los ovocitos, así como mejorar el sistema de MIV.

2.2.1.1. Factores que afectan a la calidad de los ovocitos

2.2.1.1.1. Condiciones de transporte de los ovarios al laboratorio

La duración y temperatura del transporte de los ovarios desde que son recogidos en el matadero hasta que se comienzan a procesar en el laboratorio puede influir en la calidad de los ovocitos. Walters y Graves (1998) compararon el efecto de varias temperaturas (5, 16, 25, 30 y 37°C) y tiempos (2, 6, 10, 14 y 26 h) de transporte en la posterior maduración de ovocitos porcinos. Al incrementarse el tiempo de transporte se redujo la maduración de los ovocitos, en todas las temperaturas valoradas. Los transportes de más de 5 h de duración o a temperaturas inferiores a 25°C comprometieron seriamente la maduración de los ovocitos.

2.2.1.1.2. Presencia de cuerpos lúteos y folículos quísticos en el ovario

Ocampo *et al.* (1993) han apuntado que la presencia de cuerpos lúteos en los ovarios afecta a la calidad de los ovocitos recuperados, por lo que es conveniente no

utilizar ovarios con cuerpos lúteos en los protocolos de PIV de embriones porcinos. Asimismo, es recomendable desechar aquellos ovarios que presentan folículos quísticos.

2.2.1.1.3. Tamaño del folículo

El tamaño del folículo determina la capacidad de desarrollo del ovocito. Los ovarios porcinos contienen folículos antrales con una amplia gama de diámetros, que se clasifican como pequeños (menores de 3 mm), medianos (entre 3-7 mm) y grandes (de más de 7 mm). Los ovocitos utilizados en la producción de embriones de cerdo se suelen recuperar de folículos de tamaño medio.

Yoon *et al.* (2000) utilizaron ovocitos porcinos aislados de folículos de mayor (de 3 a 8 mm) y menor (<3 mm) diámetro y determinaron que los ovocitos de folículos más grandes daban mejores tasas de maduración nuclear, formación de PNM y desarrollo hasta estadio de blastocisto, que los procedentes de folículos más pequeños. Por lo que se deduce que sólo los ovocitos que han alcanzado un grado adecuado de desarrollo pueden responder al estímulo de maduración, experimentando los cambios morfológicos y funcionales necesarios para alcanzar una total capacidad de desarrollo. Y al ser el compartimento folicular el que sostiene el crecimiento del ovocito, el desarrollo del ovocito va a estar supeditado al estadio de desarrollo del folículo en el que se encuentra.

2.2.1.1.4. Método de recuperación de los ovocitos

Aunque la recuperación de ovocitos por disección de los folículos es más laboriosa que por aspiración, asegura la recuperación de ovocitos exclusivamente de folículos no atrésicos (Ding *et al.*, 1992a). Cuando se compararon los estadios de vesícula germinal en ovocitos obtenidos de ovarios de matadero y recuperados tanto por punción de los folículos seleccionados como por aspiración folicular, se observó que los ovocitos recuperados por punción se encontraban detenidos en el estadio de VG1 en mayor proporción que los aspirados (Ebihara *et al.*, 1993). Esto sugiere que con el método de aspiración también se recuperan ovocitos de folículos cuyas células foliculares no son adecuadas para mantener el arresto meiótico en VG1, permitiendo al ovocito reanudar la meiosis.

En nuestro laboratorio, hemos observado que la aspiración de folículos con jeringa de 10 mL conectada a aguja de 18G provoca una denudación mecánica de las células del cúmulus que rodean al ovocito, cuya presencia va a ser fundamental en el proceso de maduración del ovocito.

2.2.1.1.5. Criterio de selección de los complejos cúmulus-ovocito (COCs)

Tras la recuperación de los ovocitos, una buena selección de los COCs que se van a emplear en el proceso de PIV va a ser crítica para lograr una correcta maduración de los ovocitos. En un trabajo realizado en nuestro laboratorio, los COCs fueron clasificados según el número de capas de células del cúmulus: más de tres capas con presencia del pedúnculo de unión a la pared folicular, más de tres capas sin pedúnculo, menos de tres, o ninguna, y madurados bajo las mismas condiciones (Martínez-Madrid *et al.*, 2002). No observamos diferencias en los valores de maduración nuclear en las tres primeras categorías; sin embargo tras la FIV la formación de PNM se vio incrementada en aquéllos con más de tres capas y la tasa de monospermia y el desarrollo hasta mórula fueron mejores en los que además presentaban pedúnculo.

Por otra parte se ha determinado que el aspecto del citoplasma del ovocito, homogéneo o heterogéneo, es importante a la hora de hacer la selección de los COCs. Nagashima *et al.* (1996) comprobaron que, tras la inyección subzonal de espermatozoides, la mayoría de los blastocistos obtenidos se habían desarrollado a partir de ovocitos con el citoplasma heterogéneo (7 de 56), comparado con los de citoplasma homogéneo (1 de 45).

2.2.1.1.6. Factores relativos a las hembras de las que se obtienen los ovarios

Las características de las hembras de las cuales provienen los ovarios afectan a la calidad de los ovocitos y a su capacidad de desarrollo *in vitro*. Los ovarios empleados como rutina en los laboratorios de FIV porcina proceden de hembras de matadero, por lo que el tipo de animal utilizado va a depender del matadero que nos suministre los ovarios.

De todas formas, es importante tener en cuenta estos factores, que pueden explicar, en parte, la variabilidad de resultados entre diferentes laboratorios:

- Edad: hembras prepúberes *versus* adultas:

Se ha observado un mayor desarrollo embrionario en ovocitos procedentes de ovarios de hembras adultas, comparado con los de hembras prepúberes (Marchal *et al.*, 2001). En vacuno, la adquisición de la capacidad de desarrollo aumenta con la edad de las hembras, alcanzándose tras la pubertal el nivel óptimo (Presicce *et al.*, 1997). Se ha sugerido que los ovarios de hembras prepúberes podrían no ser capaces de proporcionar las condiciones necesarias para la diferenciación del ovocito (Marchal *et al.*, 2001).

En ovino, las mitocondrias y los gránulos corticales (GC) de ovocitos MIV procedentes de ovejas prepúberes difieren en tamaño y volumen a los de los ovocitos MIV de animales adultos (O'Brien *et al.*, 1996). Funahashi y Day (1997) han sugerido que los GC de animales prepúberes podrían no disponer de la cantidad de contenido necesario para inducir una reacción cortical correcta. Pero debido a que en la mayoría de mataderos se sacrifican cerdas prepúberes y no adultas, son los ovocitos procedentes de estas primeras los más comúnmente empleados en los laboratorios de FIV porcina.

- Genotipo:

La raza de cerdos chinos Meishan se caracteriza por producir una media de 3 ó 4 lechones más por camada que las razas europeas (Haley y Lee, 1993). Se han observado diferencias en las características de maduración folicular entre la raza Meishan y las híbridas Large White, presentando los folículos preovulatorios de hembras Meishan un mayor nivel de estradiol y una mayor actividad aromataasa en las células de la granulosa y la teca (Hunter *et al.*, 1993), una mayor producción de AMPc en respuesta a la LH, y una luteinización más rápida (Hunter *et al.*, 1996). Por tanto, es posible que los folículos de las hembras de raza Meishan proporcionen un ambiente más adecuado para la maduración de los ovocitos, que contribuya a dar una prolificidad más alta.

En un interesante estudio llevado a cabo por Xu *et al.* (1998) en el que ovocitos recuperados de ovarios de matadero fueron madurados en un medio acondicionado procedente del cultivo de folículos preovulatorios de cerdas Meishan o Large White, la penetración y la formación de PNM tras la FIV fueron significativamente mayores en los ovocitos madurados en el medio acondicionado con los folículos de la raza Meishan. Estos resultados apoyan la hipótesis de que los folículos de estos animales contengan algún factor, secretado durante el cultivo de las paredes foliculares, que mejore la calidad de los ovocitos madurados.

- Estado nutricional y factores ambientales:

El estado nutricional de la hembra podría influir en el desarrollo folicular, afectando a la calidad de los ovocitos madurados *in vitro* y a su capacidad de desarrollo. Para determinar si las modificaciones en la dieta provocaban variaciones en el ambiente folicular preovulatorio que, a su vez, influyeran en la calidad de los ovocitos MIV, ovocitos procedentes de matadero fueron madurados en un medio enriquecido con fluido folicular porcino (PFF) procedente de hembras sobrealimentadas o con restricciones en la dieta (Zak *et al.*, 1997). Se comprobó que el PFF de hembras sobrealimentadas proporcionaba unas mejores condiciones para la MIV de los ovocitos porcinos. Aunque no se sabe cuáles son las variaciones en la composición del PFF según el estado nutricional del animal que provocan estas mejoras, un posible candidato sería el nivel de IGF.

La estación del año afecta a la viabilidad embrionaria. Aunque puede haber muchos mecanismos implicados en las variaciones de la fertilidad según la época del año, uno de los factores implicados podría ser los cambios en el crecimiento folicular y, por consiguiente, en la calidad de los ovocitos (Wetterman y Bazer, 1985).

2.2.1.2. Sistema de maduración *in vitro* de los ovocitos: condiciones de cultivo y medios de maduración

Las condiciones físicas específicas del ambiente en el que se maduran los ovocitos (osmolaridad, pH y composición iónica del medio; temperatura y tensión de CO₂ y O₂ del incubador; volumen de cultivo; y tiempo de incubación), así como la mayor o menor

definición del medio de maduración utilizado (suero, células somáticas, etc.) van a influir en la maduración de los ovocitos (Holm y Callesen, 1998).

2.2.1.2.1. Condiciones de cultivo

La duración del cultivo durante la MIV de los ovocitos porcinos oscila desde 36 horas (Yoshida *et al.*, 1993b) hasta 48 h (Naito *et al.*, 1988), pasando por 40 h (Funahashi y Day, 1993c) y 44 h (Wang *et al.*, 1997a). Según Ka *et al.* (1997) un cultivo de 36 h es suficiente para completar los procesos de maduración nuclear y citoplasmática, mientras que Yamauchi *et al.* (1996) apuntan que el periodo óptimo de cultivo es de 42-44 h.

La temperatura de incubación más utilizada, tanto en la MIV, la FIV y el CE es de 38,5°C ó 39°C. En un reciente estudio, Abeydeera *et al.* (2001) analizaron el efecto de dos temperaturas, 35 y 39°C, y de dos duraciones de cultivo, 44 y 68 h, durante la MIV de ovocitos porcinos sobre la maduración nuclear, la fecundación y el desarrollo embrionario posterior. El cultivo a 35°C durante 44 h redujo significativamente la tasa de maduración nuclear (12% vs 79%), comparado con la incubación a 39°C durante el mismo tiempo. La extensión del cultivo a 35°C hasta 68 h aumentó la tasa de maduración nuclear a 58%, mientras que en el caso del cultivo a 39°C, se incrementó la activación espontánea de los ovocitos. Respecto al desarrollo embrionario hasta blastocisto, el tratamiento que dio mejor resultado fue el cultivo a 39°C durante 44 h (31%), comparado con el cultivo a 35°C (13%) y a 39°C (3%) durante 68 h. Aunque se confirmó que la temperatura y el tiempo óptimos de cultivo durante la MIV son 39°C y 44h, respecto a 35°C y 68h, la extensión del tiempo de incubación a una menor temperatura permitió alcanzar tasas aceptables de desarrollo embrionario.

La atmósfera de cultivo empleada como rutina en los protocolos de PIV de embriones porcinos es de 5% de CO₂ y 95% de humedad. La utilización de incubadores con baja tensión de oxígeno (5-7%), no es frecuente en porcino.

2.2.1.2.2. Medios de maduración

Para la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos se han empleado distintos medios de cultivo, según el grupo de trabajo o el propósito del estudio. Los medios se pueden clasificar en sencillos o complejos, dependiendo de la cantidad de productos incluidos en su composición. Ejemplos de medios sencillos ampliamente utilizados en la MIV de ovocitos porcinos son el medio Whitten (Funahashi *et al.*, 1994b), el medio KRB (Krebs Ringer Bicarbonato) (Naito *et al.*, 1988), y el medio NCSU23 (*North Carolina State University*) (Abeydeera *et al.*, 1998b, 1998c), que se suelen preparar en el propio laboratorio. Entre los medios complejos más utilizados están el TCM199 (*Tissue Culture Medium 199*) (Zheng y Sirard, 1992) y el Waymouth (Yoshida *et al.*, 1993b), que debido al elevado número de componentes, se suelen adquirir en preparados comerciales.

A su vez, los medios de cultivo se dividen en definidos o indefinidos, conforme al tipo de suplementos que contengan. La tendencia actual es, en la medida de lo posible, la eliminación de suplementos no definidos, pues contienen factores desconocidos que dificultan la identificación de los mecanismos involucrados en la regulación de los procesos en estudio (Abeydeera, 2002). Además, en el caso de suplementos como el PFF, el FCS o las células somáticas, entre otros, se ha observado mucha variabilidad entre lotes y entre laboratorios, que impide la estandarización de los protocolos y la repetibilidad de los experimentos.

Pero la presencia de determinados suplementos no definidos en los medios, como el PFF (Yoshida *et al.*, 1990, 1992) o el cocultivo con células somáticas (Abeydeera *et al.*, 1998b), ha mejorado de forma notable los rendimientos de la técnica, que compensan las desventajas de su utilización. En la actualidad se están tratando de identificar y purificar los factores activos, presentes en los suplementos no definidos, responsables de estos efectos beneficiosos.

2.2.1.3. Modificaciones realizadas en el sistema de maduración *in vitro*

El problema histórico de la baja formación de PNM ha sido resuelto gracias a la aplicación de una serie de modificaciones en las condiciones de maduración de los

ovocitos. La mayoría de estas modificaciones han incrementado el contenido intracelular de GSH de los ovocitos. Del mismo modo, las futuras innovaciones en los sistemas de MIV deben ir encaminadas a favorecer, durante el periodo de la maduración, la síntesis de factores cruciales que influyan tanto sobre la calidad de ovocitos obtenidos como sobre la capacidad de desarrollo embrionario posterior.

2.2.1.3.1. Enriquecimiento con fluido folicular porcino (PFF) en sustitución de las fuentes de proteínas séricas convencionales

Los medios de maduración se suelen enriquecer con suero fetal bovino (FCS) (Cheng, 1985; Nagai y Moor, 1990), suero de cerdo recién nacido (Nagai *et al.*, 1988) y albúmina sérica bovina (BSA) (Nagai *et al.*, 1984) como fuentes de proteínas. Sin embargo, Funahashi y Day (1993a) observaron que la complementación del medio de maduración con suero reducía la capacidad de los ovocitos para formar PNM, pudiéndose deber este efecto negativo a una progresión acelerada de la maduración. Estos mismos autores (Funahashi y Day, 1993c) comprobaron que la sustitución de FCS por PFF en medio TCM199 modificado durante la MIV incrementaba la formación de PNM de 28% a 59%.

Naito *et al.* (1988) observaron que cuando los ovocitos se maduraban en medio Krebs Ringer Bicarbonato enriquecido con FSH, sólo el 20% de los ovocitos penetrados formaban PNM. Al complementar este medio con 5-100% de PFF durante la maduración se incrementaba la tasa de formación de PNM hasta el 81%; sin embargo al adicionar FCS se inhibía la maduración. Yoshida *et al.* (1990, 1992) también observaron una mejora en la maduración nuclear, la formación de PNM y el desarrollo de los ovocitos al enriquecer el medio de maduración con PFF parcialmente purificado.

El PFF está compuesto por hormonas esteroideas (principalmente estrógenos), gonadotropinas, factores de crecimiento, proteínas plasmáticas, mucopolisacáridos y enzimas, entre otros factores (Labadía, 1995). Aunque no se sabe cuales son los factores presentes en el PFF que ejercen el efecto positivo sobre la maduración citoplasmática de los ovocitos, se ha identificado que residen en la fracción I, obtenida por ultracentrifugación, y que son estables al calor, resistentes a tratamiento de congelación-

descongelación y de peso molecular inferior a 6,5 kDa (Daen *et al.*, 1994). Funahashi *et al.* (1996a) han sugerido que una serie de compuestos orgánicos presentes en el fluido folicular, como sorbitol, taurina, mioinositol, glutamina, glicina, betaína y glicerofosforil colina, podrían ser los responsables de incrementar la formación de PNM.

Por otra parte, el estadio de desarrollo de los folículos utilizados para obtener el PFF o las células foliculares, en el caso del cocultivo, tienen una influencia crucial en la maduración citoplasmática alcanzada por los ovocitos (Ding y Foxcroft, 1992, 1994a); siendo mejor la penetración y la formación de PNM cuando los folículos empleados son de mayor tamaño, y por tanto más maduros.

Como hemos visto, los medios de maduración han sido enriquecidos con diferentes porcentajes de PFF (Naito *et al.*, 1988), aunque en la actualidad el más empleado es el del 10% de PFF (Funahashi *et al.*, 1996a; Abeydeera *et al.*, 1998b, 1998c).

2.2.1.3.2. Glutathion: adición de cisteína y otros compuestos con grupos tioles

El glutathion (GSH) es un factor intracelular del ovocito crucial en la maduración citoplasmática ya que: por una parte, reduce los puentes disulfuro de la protamina de la cabeza espermática, favoreciendo la formación de PNM; y por otra, protege al ovocito contra los efectos nocivos de las especies reactivas del oxígeno generadas durante el cultivo bajo las condiciones convencionales de 5% de CO₂, manteniendo un ambiente de oxido-reducción adecuado (Meister y Tate, 1976).

El GSH es un tripéptido con grupo tiol sintetizado mediante el ciclo γ -glutamil, en el que es crucial la disponibilidad de cisteína. Yoshida (1993) comprobó que al madurar ovocitos en el medio Waymouth, que es rico en cisteína, se promovía la formación de PNM. Al mismo tiempo se estableció una correlación entre la concentración de cisteína añadida al medio de maduración y el incremento en la cantidad de GSH de los ovocitos madurados y en la formación de PNM tras la FIV (Yoshida *et al.*, 1993b); consiguiéndose al añadir 0,57mM de cisteína, la misma concentración de GSH en los ovocitos cultivados *in vitro* que en los madurados *in vivo*. Por este motivo, la concentración de cisteína con la

que se suelen complementar los medios de MIV es de 0,57 mM (Wang *et al.*, 1997a; Sawai *et al.*, 1997; Abeydeera *et al.*, 1998a).

Sawai *et al.* (1997) indicaron que la presencia de cisteína en el medio de MIV era sólo necesaria durante las últimas horas del periodo de maduración (de 42 a 48 h) para lograr una adecuada síntesis de GSH y, por consiguiente, la mejora en la formación de PNM. Sin embargo, un reciente estudio llevado a cabo por Jeong y Yang (2001) contradice esta afirmación. Estos autores compararon la adición de 1,14 mM de cisteína durante las primeras 21 h, las últimas 21 h, o el periodo completo (42 h) de MIV, sin observar diferencias ni en la división (73% vs 70% vs 78%) ni en el desarrollo hasta blastocisto (11% vs 16% vs 16%), respectivamente. Esta discrepancia de resultados puede deberse a las diferencias en los sistemas de maduración entre los dos estudios.

El mecanismo por el que la cisteína promueve la síntesis de GSH no está claramente definido, debido a las complejas comunicaciones intercelulares en los COCs. Los ovocitos desprovistos de células del cúmulus son capaces de captar cisteína del medio para sintetizar GSH mediante el sistema ASC (*), sin embargo son incapaces de captar cistina, una forma oxidada de la cisteína (Yoshida y Takahashi, 1998). Pero, la cisteína del medio se oxida rápidamente a cistina bajo las condiciones normales de cultivo de 5% de CO₂ en aire. En cambio, las células del cúmulus pueden captar tanto cisteína como cistina, mediante los sistemas ASC y Xc⁻ (*), respectivamente, para sintetizar GSH durante la MIV (Yoshida y Takahashi, 1998).

Hay que destacar el importante papel que desempeñan las uniones tipo *gap* en la regulación del flujo de GSH desde las células del cúmulus al ovocito, demostrado recientemente por Mori *et al.* (2000) utilizando un inhibidor de las uniones tipo *gap*, el heptanol. Según esto, la eficacia en la síntesis de GSH en los COCs será mayor si el medio es rico en cisteína, pues tanto los ovocitos como las células del cúmulus que lo rodean podrán captarla mediante el sistema ASC.

(*): El sistema ASC es un sistema de transporte de aminoácidos neutros dependiente del Na⁺, con preferencia por los sustratos con grupos hidroxilo y sulfidrilos en su cadena; y el sistema Xc⁻ es un sistema de transporte de aminoácidos aniónicos, no dependiente del Na⁺.

Según Yamauchi y Nagai (1999), la cisteamina, un compuesto con grupo tiol con función reductora, aumentó el contenido de GSH y promovió la formación de PNM, incluso en ovocitos porcinos desprovistos de células del cúmulus. La cisteamina actúa reduciendo la cistina a cisteína (Nagai, 2001) en TCM199, un medio rico en cistina. También el β -mercaptoetanol, otro compuesto con grupo tiol, incrementó la concentración de GSH en ovocitos madurados en NCSU23 enriquecido con cisteína y mejoró su desarrollo embrionario hasta blastocisto (Abeydeera *et al.*, 1998a).

2.2.1.3.3. Gonadotropinas: duración de la exposición hormonal

La complementación hormonal de los medios de MIV mejora la maduración nuclear y la expansión del cúmulus (Meinecke Meinecke-Tillmann, 1979). Además, las gonadotropinas ejercen una acción positiva sobre la formación de PNM (Wang y Niwa, 1995). Por esta razón, los ovocitos porcinos se suelen cultivar en medios de maduración enriquecidos con diferentes combinaciones de gonadotropinas y estradiol, como por ejemplo: eCG-hCG (Abeydeera *et al.*, 1998b), eCG-hCG-estradiol (Funahashi y Day, 1993c), FSH-LH (Mori *et al.*, 2000) y FSH-LH-estradiol (Zheng y Sirard, 1992).

Por otra parte, la maduración citoplasmática requiere una precisa secuencia de cambios hormonales (Osborn y Moor, 1983), pues en condiciones fisiológicas la composición de hormonas gonadotrópicas y esteroides en el PFF cambia de manera brusca durante el periodo preovulatorio (Ainsworth *et al.*, 1980). Funahashi y Day (1993c) evaluaron el efecto de diferentes tiempos de exposición hormonal sobre el grado de maduración del ovocito. Para ello, maduraron COCs porcinos en TCM-199m enriquecido con eCG, hCG y estradiol en varios periodos de tiempo, retirando a continuación la complementación hormonal y dejando a los ovocitos en cultivo hasta completar un total de 40 horas. Estos autores comprobaron que no había diferencias en la maduración nuclear (88-90%) ni en la tasa de penetración (96%) entre los ovocitos madurados en medio enriquecido con hormonas sólo durante las primeras 20 h o durante las 40 h totales, sin embargo el grado de expansión del cúmulus y el porcentaje de formación de PNM (67% vs 36%) mejoraron de forma notoria cuando los ovocitos se cultivaron con hormonas las primeras 20 h y sin ellas las 20 h posteriores. Estos resultados demuestran que la presencia de hormonas durante la última etapa de maduración tiene efectos negativos sobre la

maduración citoplasmática y que, por consiguiente, la formación de PNM se ve incrementada al retirar la complementación hormonal del medio de MIV a partir de las 20 h de cultivo.

2.2.1.3.4. Adición del factor de crecimiento epidérmico (EGF)

Los factores de crecimiento tienen un papel regulador, tanto autocrino como paracrino, en las funciones ováricas. Se sabe que el fluido folicular porcino contiene niveles significativos de EGF, aproximadamente 15 ng/mL (Hsu *et al.*, 1987), y se han encontrado en el ovario sitios de unión para este factor que fluctúan según el estado de maduración del folículo (Feng *et al.*, 1987). Además, se ha demostrado la presencia de ARNm, de su receptor (EGF-R) y del péptido EGF en el ovocito y en las células del cúmulus y de la granulosa (Singh *et al.*, 1995), lo que indica que existe una producción local de EGF por parte de estos tejidos.

El efecto estimulador del EGF sobre la MIV de los ovocitos se ha probado en varias especies: cerda (Ding y Foxcroft, 1994b), rata (Dekel y Scherizly, 1985), ratón (Downs *et al.*, 1988), vaca (Lorenzo *et al.*, 1994; Lonergan *et al.*, 1996) y mujer (Das *et al.*, 1991). En porcino, la acción del EGF sobre la maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos debe estar, en parte, mediada por su unión a los receptores presentes en las células del cúmulus, pues al madurar ovocitos desnudos en presencia o ausencia de EGF, no se observaron diferencias en los porcentajes de reanudación de la meiosis (Coskum y Lin, 1992) ni en la formación de PNM (Wang y Niwa, 1995). Además, Ding y Foxcroft (1994b) demostraron que el EGF era capaz de estimular por sí solo la maduración nuclear en ovocitos rodeados por células del cúmulus, pero que precisaba la interacción con las gonadotropinas para incrementar la maduración citoplasmática.

Los receptores para el EGF en las células de la granulosa se ven incrementados por el tratamiento con FSH (Fujinaga *et al.*, 1992) y reducidos por tratamiento con LH/hCG (Feng *et al.*, 1987); y a su vez, el EGF suprime el incremento, mediado por la FSH, de receptores para la LH en las células de la granulosa (May y Schomberg, 1989). Harper y Brackett (1993) han sugerido que estas interacciones entre el EGF y las gonadotropinas en la regulación de los receptores podrían desempeñar un importante papel durante la maduración de los ovocitos. Desde un punto de vista funcional, las interacciones entre el

EGF y las gonadotropinas podrían dar lugar a cambios en la esteroidogénesis de los tejidos foliculares, que afectarían a la maduración del ovocito (Ding y Foxcroft, 1994b). Wang y Niwa (1995) establecieron un efecto sinérgico del EGF y las gonadotropinas eCG y hCG en la maduración citoplasmática de los ovocitos porcinos, en un medio libre de proteínas.

Por otra parte, Abeydeera *et al.* (1998c, 1999b) comprobaron que la adición de 10 ng/mL de EGF a un medio de maduración con PFF (1998c) o libre de proteínas (1999b) mejoraba sustancialmente el posterior desarrollo embrionario hasta blastocisto (42% con EGF vs 21% sin adición, en presencia de PFF; y 37% con EGF vs 22% sin adición, en medio libre de proteínas); y lograron el nacimiento de lechones tras la transferencia embrionaria (Abeydeera *et al.*, 1998c). Además, la presencia de EGF durante la maduración de los ovocitos incrementó la concentración intracelular de GSH (11,4 vs 5,9 pmol/ovocito) y el número de células de los blastocistos (37-41 vs 26 células) (Abeydeera *et al.*, 1999b). Por lo que el efecto positivo de la adición de EGF sobre la formación de PNM y sobre el desarrollo embrionario podría venir mediado por el aumento intracelular de GSH en los ovocitos madurados.

La concentración de EGF como suplemento en los medios de MIV porcinos más empleada es la de 10 ng/mL. En un estudio en el que se analizaron diferentes concentraciones de EGF (0, 1, 10, 20 y 40 ng/mL), no se observaron diferencias en el porcentaje de ovocitos que alcanzaron la MII a las 44 h, aunque sí fue mayor este porcentaje a las 33 h de maduración en el caso de la concentración de 40 ng/mL de EGF (Abeydeera *et al.*, 1998c). El desarrollo hasta blastocisto fue superior para la concentración de 10 ng/ml (42%), sin encontrarse diferencias significativas entre 1 y 20 ng/mL (33% vs 35%) ó entre 0 y 40 ng/mL (21% vs 24%) (Abeydeera *et al.*, 1998c). La reducción del desarrollo embrionario a concentraciones superiores a 10 ng/mL pudo deberse a la aceleración de la maduración nuclear experimentada por los ovocitos que, como consecuencia, provocó un envejecimiento de los mismos, pudiendo comprometer su capacidad de desarrollo posterior.

El mecanismo de acción del EGF en la inducción de la maduración de los ovocitos porcinos fue estudiado por Coskun y Lin (1995), quienes sugirieron que el EGF podría actuar estimulando la ruta de la proteinkinasa C. Asimismo, recientemente se ha

descubierto que el EGF estimula, en los COCs provenientes de folículos de 6-7 mm, la producción de ácido hialurónico y su retención dentro de la matriz extracelular de los cúmulus expandidos (Prochazka *et al.*, 2000). Como se verá en el apartado de FIV, el ácido hialurónico estimula la capacitación de los espermatozoides sin inducir la reacción espontánea del acrosoma (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1997, 1998a), lo que tiene un efecto positivo sobre la monospermia.

2.2.1.3.5. Células somáticas foliculares

La maduración de ovocitos porcinos en presencia de células foliculares o de sus secreciones es beneficiosa para la formación de PNM (Mattioli *et al.*, 1988a; Zheng y Sirard, 1992), como quedó demostrado en estudios de MIV de ovocitos porcinos, en los que se utilizaron tanto ovocitos unidos a la pared completa del folículo extravertido (Ding y Foxcroft, 1992) como medios acondicionados derivados del cultivo de ovocitos unidos a la pared del folículo (Mattioli *et al.*, 1988a, 1988b). Posteriormente, Mattioli *et al.* (1989) verificaron la mejora en la maduración citoplasmática de los ovocitos al obtener, en condiciones similares de maduración, el nacimiento de crías tras la transferencia de embriones MIV-FIV.

El cocultivo de COCs con fragmentos de pared folicular (FPF), seguido de activación eléctrica de los ovocitos (Liu *et al.*, 1997) dio lugar a una mayor división celular. En un estudio más reciente, Abeydeera *et al.* (1998b) examinaron el efecto del cocultivo de ovocitos porcinos con FPF (que contenían células de la granulosa y de la teca) durante la MIV y confirmaron la mejora en la maduración citoplasmática de los ovocitos, al incrementarse de manera notable la concentración intracelular de GSH en los ovocitos cocultivados con FPF, comparado con la no adición de FPF (8,7 vs 6,4 posm/ovocito). Además, el cocultivo con FPF incrementó significativamente el desarrollo hasta blastocisto (36% vs 18% sin cocultivo), que podría ser debido al efecto protector del GSH sobre el daño oxidativo a lo largo del cultivo embrionario en condiciones de 5% de CO₂ y 20% de O₂. Se sugirió que este incremento en la producción de GSH se podría producir gracias a la reducción de la tensión de oxígeno en presencia de FPF, como ha quedado demostrado en cultivos con células de oviducto (Bavister, 1988), de modo que se aminorara la oxidación

de la cisteína del medio y pudiera ésta ser utilizada por los ovocitos y las células del cúmulus para sintetizar GSH.

Estos hallazgos sugieren que las células foliculares secretan, durante el cultivo, una serie de sustancias que van a jugar un papel importante en la maduración de los ovocitos, mejorando la maduración citoplasmática y/o eliminando factores perjudiciales del medio (Abeydeera *et al.*, 1998c). Entre las sustancias secretadas por las células de la granulosa durante el cultivo *in vitro* se encuentran el TIMP-1 (inhibidor tisular de las metaloproteinasas) (Funahashi y Day, 1997) y el IGF (factor de crecimiento similar a la insulina) (Hammond *et al.*, 1985). Como veremos en el apartado 2.2.1.3.8, la adición de TIMP-1 al medio de maduración aumenta la capacidad de desarrollo preimplantacional de los ovocitos (Funahashi *et al.*, 1997c). Asimismo, la presencia de IGF-1 durante la MIV de ovocitos porcinos es también beneficiosa para el posterior desarrollo hasta blastocisto (Xia *et al.*, 1994).

Aunque no se conoce el mecanismo a través del cual determinados factores secretados por las células foliculares influyen en el proceso de la maduración, en parte puede ser debido a que ayudan a mantener una correcta comunicación intercelular entre el ovocito y las células del cúmulus (Mattioli *et al.*, 1988a); lo que favorece la cooperación metabólica entre estas células (Mattioli *et al.*, 1988b) y estabiliza la distribución de los gránulos corticales en el citoplasma (Galeati *et al.*, 1991).

Sin embargo, Liu *et al.* (1997) sugieren que la maduración completa de los ovocitos porcinos no es sólo consecuencia de las acciones ejercidas por los factores secretados por las células foliculares, sino de su acción combinada con las gonadotropinas presentes en el medio de maduración. Ding y Foxcroft (1994b) demostraron que la presencia combinada de células foliculares y gonadotropinas durante la MIV de los ovocitos porcinos ayudaba a mantener los niveles de progesterona y estradiol del medio en unas proporciones adecuadas.

No obstante, el uso de células foliculares en sistemas de cultivo estáticos tiene detractores (Nagai, 2001), que argumentan que la presencia de un elevado número de estas células en un pequeño volumen de medio de maduración puede ser perjudicial para los

ovocitos porcinos, debido a los altos niveles de progesterona secretados por las células foliculares diferenciadas, una vez se adhieren al suelo de las placas de cultivo (Nagai *et al.*, 1993). Para prevenir esta adhesión celular, se podrían establecer sistemas no estáticos de cultivo (Staigmiller y Moor, 1984).

2.2.1.3.6. Efecto negativo de altos niveles de NaCl en el medio: reducción de la concentración de NaCl y adición de sorbitol

La maduración de ovocitos porcinos en dos medios, cuya principal diferencia es el contenido de NaCl (medio Whitten: 68,5 mM y medio TCM-199: 116 mM), dio lugar a diferencias en la tasa de formación de PNM, siendo superiores las obtenidas al utilizar el medio Whitten (Funahashi *et al.*, 1994c). Se sugirió que altas concentraciones de NaCl en el medio de maduración podían ocasionar una inadecuada maduración citoplasmática. Para demostrarlo, Funahashi *et al.* (1994b) cultivaron ovocitos porcinos en medio Whitten y vieron que al reducir la concentración de NaCl de 68,5 a 44,5 mM se incrementaba de manera significativa la formación de PNM y la concentración intracelular de GSH en los ovocitos, mientras que se reducía al elevar la concentración de NaCl a 92 y 140 mM.

Al mismo tiempo, se detectó que el espacio perivitelino de los ovocitos madurados en medio Whitten con bajo nivel de NaCl era más ancho y los ovocitos menos poliespérmicos (Funahashi *et al.*, 1994b). El espacio perivitelino de los ovocitos MIV suele ser más estrecho que el de los madurados *in vivo*, y ello podría interferir en la adecuada diseminación del contenido de los gránulos corticales, retrasando el establecimiento de la reacción cortical. Por lo que se ha planteado, como una futura vía para solucionar el problema de la poliespermia, el estudio de medios de MIV con los que se obtengan ovocitos con un espacio perivitelino más ancho.

Por otra parte, al utilizar en la maduración de ovocitos porcinos el medio Whitten (68,5 mM de NaCl) complementado o no con sorbitol (Funahashi *et al.*, 1996a), se obtuvieron mayores niveles de GSH intracelular y un desarrollo a blastocisto superior con la complementación. Asimismo, los ovocitos madurados en presencia de sorbitol exhibieron una organización normal de los microfilamentos. Según estos resultados, se

sugirió que el sorbitol era capaz de mantener unas fuerzas iónicas apropiadas cuando el medio extracelular contenía altos niveles de NaCl.

2.2.1.3.7. Sincronización del desarrollo de los ovocitos

En la mayoría de los sistemas de MIV, los ovocitos se recogen por aspiración de folículos de tamaño medio (3-7 mm) de ovarios de matadero. Al clasificarlos según las características morfológicas establecidas por Motlik y Fulka (1976), se ha observado una amplia variabilidad en la morfología nuclear de la vesícula germinal (VG) de estos ovocitos (Funahashi *et al.*, 1997a; Guthrie y Garrett, 1999), que podría influir en su progresión meiótica, maduración citoplasmática y posterior desarrollo embrionario (Abeydeera, 2002). Por el contrario, la morfología nuclear del estadio de VG está muy sincronizada en las cerdas en el momento del pico preovulatorio de la LH (Funahashi *et al.*, 1996b).

Se han descrito diversas modificaciones en las condiciones de cultivo, con la finalidad de sincronizar el estadio de VG entre la recuperación de los ovocitos de los folículos y la rotura de la VG. Funahashi *et al.* (1997a) preincubaron ovocitos en medio de MIV sin hormonas durante 12 h antes de la MIV y comprobaron que los ovocitos preincubados se desarrollaban a blastocisto en mayor proporción que los no sometidos a preincubación (9% vs 23%). Un periodo de cultivo previo a la maduración podría permitir que los ovocitos de folículos más pequeños (dentro de la categoría media) alcanzara un estadio similar al de los ovocitos de folículos mayores (Abeydeera, 2002).

En otro experimento, estos mismos autores expusieron a los ovocitos a dibutilil APM cíclico (dbAMPc) durante las primeras 20 h de MIV, sin incubación previa (Funahashi *et al.*, 1997b). La presencia de dbAMPc no afectó a la tasa de maduración o de penetración, pero incrementó la homogeneidad de la maduración nuclear de los ovocitos. Además, el desarrollo embrionario a blastocisto se incrementó notablemente en presencia de dbAMPc respecto a los controles (22% vs 4%). La hipoxantina (Miyano *et al.*, 1995), al igual que el dbAMPc (Funahashi *et al.*, 1997b) inhibe la reanudación de la meiosis de manera reversible, por lo que el tratamiento con hipoxantina durante la MIV puede ser que produzca el mismo efecto que el dbAMPc sobre el ovocito.

2.2.1.3.8. Adición de inhibidor tisular de las metaloproteinasas-1 (TIMP-1)

El TIMP-1 (inhibidor tisular de las metaloproteinasas-1) es secretado por las células de la granulosa (Smith *et al.*, 1994) y de la teca (Shores, 1999) porcinas en la fase preovulatoria, y parece ser un factor esencial para que el ovocito alcance la capacidad de desarrollo preimplantacional. Funahashi *et al.* (1997c), combinando el efecto del dbAMPc y del TIPM-1, diseñaron un protocolo de MIV en dos fases en el que cultivaron a los ovocitos en presencia de dbAMPc durante las primeras 20 h de maduración y con TIPM-1 las restantes 24 h de cultivo, obteniendo unos altos porcentajes de blastocistos (34%) tras la FIV de los ovocitos, sin verse afectados los factores asociados a la fecundación.

Se desconoce el mecanismo por el cual el TIPM-1 es capaz de mejorar el desarrollo a blastocisto de los ovocitos porcinos sin afectar a la fecundación. Es interesante apuntar que el momento efectivo de la adición de TIMP-1 al medio de MIV (a partir de las 20 h) coincide con el momento de síntesis de la ciclina B1 y las MAP kinasas. Las MAP kinasas están involucradas en la regulación de la maduración meiótica de los ovocitos, especialmente tras la rotura de la VG (Inoue *et al.*, 1995). Para clarificar este efecto estimulador por parte de la TIPM-1 se necesitan futuras investigaciones.

2.2.1.3.9. Enriquecimiento con fluido oviductal porcino o con glicoproteína específica del oviducto porcino (pOSP)

En un interesante estudio llevado a cabo por Day *et al.* (2000b), se compararon parámetros morfológicos, físicos y de FIV de ovocitos MIV, ovocitos madurados *in vivo* ovulados, y ovocitos madurados *in vivo* no ovulados procedentes de folículos preovulatorios y que, por tanto, todavía no habían sido expuestos al ambiente oviductal. A diferencia de los ovulados, los ovocitos MIV y los preovulatorios se asimilaron en los parámetros evaluados. En este mismo estudio, expusieron a los ovocitos MIV al oviducto en estro de una hembra durante un periodo de 4 h, mediante transferencia quirúrgica, y comprobaron que los ovocitos MIV sufrieron los mismos cambios morfológicos y físicos que los apreciados en los ovulados. Además, los ovocitos MIV expuestos al oviducto tuvieron las mismas tasas de penetración que los no expuestos (87% vs 83%), pero una poliespermia mucho menor (26% vs 67%). Hay que destacar la estrecha similitud entre

estos resultados y los obtenidos por Wang *et al.* (1998), al analizar la incidencia de poliespermia tras la FIV en ovocitos MIV (65%) comparado con ovocitos ovulados (28%).

Parece evidente que tras la ovulación, los ovocitos porcinos sufren modificaciones dentro del oviducto que van a desempeñar un importante papel en la prevención de la poliespermia. Coy *et al.* (1999) transfirieron ovocitos MIV a hembras receptoras y los fecundaron en condiciones *in vivo*, obteniendo descendencia viva. Es decir, que el establecimiento de un método realmente eficaz de prevención de la poliespermia podría pasar por la exposición de los ovocitos a un medio que imitase, en la medida de lo posible, al oviductal.

En un estudio llevado a cabo por Kim *et al.* (1996), en el que los ovocitos MIV fueron cocultivos 1,5 h antes de la FIV con fluido oviductal (FO) de cerdas en día 20-21 del estro, se consiguió una reducción de la poliespermia. Al observar, mediante microscopía láser, la reacción cortical experimentada tras la FIV por estos ovocitos y por ovocitos ovulados se comprobó que era de similar intensidad (Kim *et al.*, 1996). Estos autores sugirieron que algunas de las glicoproteínas del FO podrían entrar en el espacio perivitelino, facilitando la exocitosis sincronizada de los gránulos corticales y promoviendo la reacción de zona.

De modo que, parece ser que los ovocitos no desarrollan completamente la capacidad de experimentar una reacción cortical eficaz hasta que no alcanzan el oviducto y se exponen a sus secreciones (Wang *et al.*, 1998). Este hallazgo apunta la posibilidad de que el FO contenga algún factor que, de algún modo, favorezca el establecimiento de una correcta reacción cortical que evite la entrada en el ovocito de más de un espermatozoide. Lamentablemente, la dificultad en la obtención de FO de hembras en día 20-21 de estro es un obstáculo para la implantación de esta mejora como rutina, por lo que sería de gran utilidad descubrir y aislar estos factores activos del FO.

Se han identificado una serie de proteínas sintetizadas y secretadas por el oviducto en respuesta a las hormonas ováricas. La más abundante es una glicoproteína estrógeno-dependiente conocida como pOSP (Buhi *et al.*, 2000). Esta glicoproteína se ha localizado

en la ZP y espacio perivitelino de los ovocitos oviductales, lo que sugiere un posible papel dentro de la interacción del ovocito con el espermatozoide (Buhi *et al.*, 1993).

En un estudio realizado por Kouba *et al.* (2000), en el que los ovocitos fueron expuestos a pOSP antes y durante la FIV, se obtuvo una notable reducción de la poliespermia respecto al control (29% vs 61%) y una disminución de la unión de espermatozoides a la ZP, sin que la tasa de penetración se viese comprometida. Este tratamiento también mejoró el desarrollo a blastocisto de los embriones MIV-FIV. Pero, al exponer a los ovocitos al pOSP tanto antes como durante la fecundación, no se pudo determinar si este efecto beneficioso se debía a la interacción de la glicoproteína con los ovocitos y/o con los espermatozoides. Un estudio reciente (McCauley *et al.*, 2001), en el que sólo los ovocitos fueron expuestos a la pOSP y en el que también se logró reducir la poliespermia, ha demostrado, al menos, el efecto positivo de la interacción de la pOSP con los ovocitos.

2.2.2. Fecundación *in vitro*

La fecundación de ovocitos porcinos en el oviducto de la hembra tiene lugar durante unas pocas horas después de la ovulación, y en el 95% de los casos la penetración es monospermica (Abeydeera, 2002). En los animales de laboratorio y domésticos, la relación de espermatozoides/ovocito en el momento inicial de la penetración es cercano a la unidad, y esta proporción aumenta sólo tras el establecimiento del bloqueo de la poliespermia en la ZP (Hunter, 1993). No obstante, en la especie porcina al depositar de forma artificial un número excesivo de espermatozoides en el oviducto de las hembras en el momento de la fecundación, también un alto porcentaje de ovocitos sufrieron penetraciones poliespéricas *in vivo* (Hunter, 1973).

A diferencia de la situación *in vivo*, *in vitro* los ovocitos son expuestos a un elevado número de espermatozoides capacitados durante un largo periodo, dando lugar en muchos de los casos a penetraciones poliespéricas (Nagai, 1994). La incidencia y el grado de la poliespermia son una indicación del número de espermatozoides capacitados en la proximidad inmediata de los ovocitos porcinos ovulados *in vivo*, según Hunter y Nichol

(1988); lo que también se cumple en el caso de los madurados y fecundados *in vitro*, según Abeydeera *et al.* (1997). Por otra parte, de acuerdo con Wang *et al.* (1999b), la poliespermia *in vitro* podría deberse a un retraso en el establecimiento de la reacción de la ZP unido a la penetración simultánea de los espermatozoides; por lo que al incrementarse el número de espermatozoides en las cercanías del ovocito, se aumenta la probabilidad de penetraciones simultáneas.

Los espermatozoides que acaban de sufrir o están experimentando una reacción acrosómica espontánea son capaces de unirse fuertemente a la ZP del ovocito gracias a la proacrosina de su matriz acrosomal, considerada como una molécula de unión secundaria (Jones, 1990); por lo que no sólo los espermatozoides capacitados, sino también los parcial o recientemente reaccionados son capaces de penetrar al ovocito. Además, el tiempo que emplean los espermatozoides parcialmente reaccionados en penetrar al ovocito es menor que en el caso de los capacitados, pues estos últimos aún tienen que sufrir la reacción acrosómica tras la interacción con la ZP (Funahashi y Nagai, 2001).

Según un reciente trabajo realizado por Funahashi y Nagai (2001), un gran número de penetraciones poliespérmicas podrían estar provocadas por la penetración simultánea en el ovocito de espermatozoides que acaban de experimentar una reacción acrosómica espontánea. Teniendo en cuenta los resultados del trabajo anteriormente citado (Funahashi y Nagai, 2001), se podría ampliar la afirmación hecha por Hunter y Nichol (1988) diciendo que: la incidencia y el grado de la poliespermia *in vitro* son una indicación del número de espermatozoides capacitados, parcialmente reaccionados y/o que acaban de experimentar una reacción acrosómica espontánea, presentes en la proximidad inmediata de los ovocitos porcinos.

La penetración espermática activa al ovocito que, en respuesta, libera el contenido de los gránulos corticales (GC) al espacio perivitelino. La exocitosis de los GC juega un importante papel en la modificación de las propiedades de la ZP y/o en el establecimiento del bloqueo de la poliespermia (Yanagimachi, 1994).

Wang *et al.* (1997b) observaron una exocitosis incompleta en los ovocitos porcinos inmaduros nuclearmente y retrasada en los que alcanzaron el estadio de metafase II,

sugiriendo que la poliespermia de los ovocitos MIV podía ser consecuencia de una inadecuada maduración citoplasmática. A su vez, Cran y Cheng (1986) y Yoshida *et al.* (1993a) comprobaron que tanto los ovocitos madurados y fecundados *in vivo* como *in vitro* eran capaces de liberar el contenido de los GC tras la penetración; pero encontraron algunas diferencias en la exocitosis de los GC entre ambos, principalmente una liberación más rápida y una mayor dispersión de su contenido en el espacio perivitelino en el caso de los madurados y fecundados *in vivo*. Por el contrario, Wang *et al.* (1998) compararon la liberación de los GC en ovocitos MIV y ovulados 6 h después de la FIV, sin observar diferencias ni en el tiempo ni en el grado en que se produjo la exocitosis; aunque la incidencia de poliespermia en los ovocitos MIV comparado con los ovulados continuó siendo mucho mayor (65% vs 28%).

Las diferencias existentes entre las condiciones de fecundación *in vivo* e *in vitro*, y no sólo los problemas relacionados con una inadecuada maduración, se han planteado como una posible causa de la elevada incidencia de la poliespermia *in vitro*. Para corroborar esta hipótesis, Coy *et al.* (1993) fecundaron *in vitro* ovocitos que habían sido madurados *in vivo*, y comprobaron que también sufrían penetraciones poliespérmicas.

Tomando en conjunto lo descrito anteriormente, hay que pensar en la poliespermia como un problema complejo en el que están involucradas tanto las condiciones de MIV del ovocito, como las de capacitación *in vitro* del semen y de cocultivo *in vitro* de los espermatozoides con los ovocitos. Por lo que la reducción de la poliespermia se debería abordar incidiendo en todos y cada uno de los puntos críticos que se presentan a lo largo del proceso de MIV-FIV de ovocitos porcinos. Según Abeydeera (2002), el sistema ideal de FIV porcina sería aquél con el que se logaran tasas de penetración superiores al 80% con una poliespermia inferior al 10%.

2.2.2.1. Factores que afectan a la penetración y a la poliespermia durante la capacitación espermática y/o la fecundación *in vitro*

2.2.2.1.1. Procedencia de los espermatozoides

En muchos laboratorios, el semen eyaculado no congelado es la principal fuente de espermatozoides utilizada como rutina en los estudios de FIV porcina (Abeydeera, 2002). Sin embargo, Xu *et al.* (1996a, 1996b) observaron grandes variaciones en las tasas penetración y poliespermia entre verracos, así como entre diferentes fracciones del mismo eyaculado. Estos mismos autores comprobaron que al utilizar sólo la fracción rica en espermatozoides del eyaculado, se reducía la variabilidad entre diferentes eyaculados recogidos del mismo macho. Para disminuir la variabilidad debida al macho al utilizar semen fresco, Long *et al.* (1999) han sugerido el empleo de un sólo macho en todas las réplicas de un mismo experimento. De todos modos, también se han observado diferencias en las tasas de penetración y poliespermia al utilizar diferentes eyaculados de un mismo verraco para la FIV (Sirard *et al.*, 1993).

El semen refrigerado, es decir, semen fresco eyaculado diluido en medio de conservación y mantenido a 15-16°C, también ha sido empleado para la FIV porcina por diversos autores (Gruppen *et al.*, 1997; Gruppen y Nottle, 2000). El empleo de semen refrigerado permite la utilización de verracos no alojados en las proximidades del laboratorio donde se va a realizar la fecundación *in vitro*, sin necesidad de que el semen tenga que ser congelado.

Al utilizar semen congelado procedente de un sólo eyaculado a lo largo de un mismo experimento se elimina la variabilidad entre eyaculados (Abeydeera y Day, 1997a; Wang *et al.*, 1991). Sin embargo, se ha demostrado que al emplear semen congelado para la FIV, el proceso de capacitación y de pérdida espontánea del acrosoma se acelera en los espermatozoides congelados-descongelados (Wang *et al.*, 1995); y que tras la descongelación, los espermatozoides sufren un rápido descenso de la movilidad (Nagai *et al.*, 1988). Además, el protocolo de FIV que funciona bien para el semen congelado de un macho, puede no dar buenos resultados con otros verracos, por lo que para cada lote determinado de semen congelado se ha de ajustar el protocolo de FIV.

El semen congelado, a su vez, puede provenir de espermatozoides eyaculados o epididimales. Rath y Niemann (1997) compararon la capacidad de fecundación *in vitro* del semen eyaculado fresco o congelado, o del semen de epidídimo congelado, procedente en los tres casos de los mismos verracos. Al evaluar el porcentaje de espermatozoides móviles tras la descongelación y dilución final, observaron que el de los espermatozoides de epidídimo congelados (72%) era similar al de los eyaculados frescos (76%) y mejor que el de los eyaculados congelados (40%); observando menor variabilidad entre verracos en el caso de los espermatozoides epididimales. Asimismo, las tasas de división embrionaria fueron mejores al utilizar espermatozoides de epidídimo (60%) que eyaculados (15% con frescos y 16% con congelados).

Según Yanagimachi (1994) el hecho de que los espermatozoides eyaculados presenten una mayor resistencia a la capacitación *in vitro* que los epididimales se puede deber a que su membrana plasmática es más estable, ya que ha entrado en contacto con los factores de decapitación presentes en el plasma seminal que se adhieren firmemente a su superficie, dificultando el proceso de capacitación. Quizá esto explique los mejores resultados obtenidos con los espermatozoides de epidídimo. No obstante, el uso de espermatozoides de epidídimo presenta el inconveniente de que, al ser recogidos tras la muerte del animal, se excluye su utilización para el estudio de semen de verracos vivos de alto valor genético (Niemann y Rath 2001).

2.2.2.1.2. Preincubación espermática

La capacitación *in vitro* de espermatozoides de verraco se consiguió por primera vez gracias a Nagai *et al.* (1984), quienes preincubaron semen procedente de epidídimo a concentraciones altas (2×10^8 spz/mL) durante 4 horas antes de la FIV en medio Krebs Ringer Bicarbonato modificado. Cheng (1985) consiguió capacitar semen eyaculado en medio TCM199 utilizando un protocolo similar, aunque con niveles más elevados de calcio y con un pH superior. Posteriormente, se comprobó que la preincubación espermática no era necesaria para lograr la penetración, si el medio de FIV era rico en calcio (Martínez *et al.*, 1996).

Mattioli *et al.* (1996), comprobaron que el semen eyaculado fresco o el refrigerado conservado a 16°C durante 1-3 días respondían de un modo diferente al tratamiento de preincubación, utilizando para valorar el estado funcional de los espermatozoides la tinción de clortetraciclina (CTC). Al inicio del periodo de preincubación, el semen refrigerado conservado durante 3 días presentaba un mayor porcentaje de espermatozoides capacitados que el conservado durante 1 día o que el recién recogido. Sin embargo, la evolución del patrón de capacitación durante la preincubación fue diferente; ya que la capacitación en el semen fresco se produjo de un modo progresivo a lo largo de las 3 horas de incubación, mientras que el semen refrigerado presentó un mayor porcentaje de espermatozoides capacitados en la primera hora de incubación, sin incrementarse éste al prolongarse el tiempo de incubación. Por lo que estos autores (Mattioli *et al.*, 1996) recomendaron periodos de preincubación de 3-4 horas para el semen fresco, y más reducidos para el semen refrigerado. Por otra parte, se ha descrito que la preincubación en semen eyaculado congelado y descongelado reduce notablemente el porcentaje de espermatozoides móviles (Nagai *et al.*, 1988).

La composición del medio en el que se preincuba a los espermatozoides afecta a los parámetros de la fecundación (Nagai *et al.*, 1984; Funahashi y Day, 1993b). En ausencia de PFF (Nagai *et al.*, 1984), se vio que la preincubación estimulaba la capacitación e incrementaba las tasas de penetración y poliespermia. Al añadir PFF durante la preincubación, Funahashi y Day (1993b) observaron que se estimulaba la capacitación y la pérdida espontánea del acrosoma, de modo que durante la FIV se reducía la proporción de espermatozoides capacitados y la incidencia de poliespermia. La preincubación durante 90 minutos en medio TCM199m con 0,4% de BSA enriquecido con 0,1% y 1% de PFF reducía significativamente los niveles de poliespermia (36% y 32%, respectivamente), comparado con la no adición (77%), manteniendo las mismas tasas de penetración. Pero al aumentar la concentración de PFF a un 10%, la proporción de ovocitos penetrados se reducía hasta el 37% debido a un marcado incremento de reacciones acrosómicas espontáneas durante la preincubación (Funahashi y Day, 1993b). Sin embargo, la sustitución en el medio de preincubación de la BSA por 10% de FCS bloqueaba el efecto beneficioso del PFF sobre la poliespermia. Según Cran y Cheng (1986), la presencia de FCS durante la FIV reduce la disponibilidad de calcio en el medio, de modo que la reacción cortical no puede ser inducida.

2.2.2.1.3. Concentración espermática

La concentración de espermatozoides presentes durante el cocultivo con los ovocitos afecta a la penetración y la poliespermia (Abeydeera y Day, 1997a); ya que a mayor concentración de semen, se va a capacitar un mayor número de espermatozoides. Como comentamos anteriormente, la incidencia y el grado de la poliespermia son una indicación del número de espermatozoides capacitados, así como de aquéllos que acaban de reaccionar o están experimentando una reacción acrosómica espontánea, presentes en las inmediaciones de los ovocitos durante la FIV (Abeydeera *et al.*, 1997; Funahashi y Nagai, 2001). Asimismo, Rath (1992) apuntó la elevada correlación existente entre el número absoluto de espermatozoides por ovocito presentes durante la FIV y la incidencia de poliespermia.

Según esto, una sencilla solución al problema de la poliespermia pasaría por la reducción del número de espermatozoides presentes durante el cocultivo con los ovocitos. Sin embargo, la reducción de la concentración espermática suele venir acompañada de unas bajas tasas de penetración. Los protocolos de FIV deben diseñarse de modo que durante el cocultivo, los ovocitos estén expuestos a un número adecuado de espermatozoides capacitados, manteniendo así un equilibrio entre la penetración y la poliespermia; ya que si el número es inferior, la tasa de penetración se verá reducida, mientras que si es demasiado elevado, se incrementará la poliespermia.

En este diseño también se han de tener en cuenta las variaciones en la calidad del semen, debidas tanto a diferencias individuales entre los verracos como a los daños causados por los procesos de congelación del semen (Nagai, 1996), así como diferencias en la composición del medio de FIV (Kidson *et al.*, 2001; Martínez-Madrid *et al.*, 2001; Funahashi y Nagai, 2001), pues todo ello puede modificar el patrón de capacitación; por lo que la concentración espermática va a tener que ser ajustada para cada situación concreta.

2.2.2.1.4. Tiempo de cocultivo de los ovocitos con el semen

Al igual que ocurre con la concentración espermática, una vez se ha alcanzado el nivel máximo de penetración, la extensión de la duración del cocultivo sólo va a dar lugar

a un incremento en la tasa de poliespermia (Abeydeera, 2001); por lo que se recomienda que el tiempo de cocultivo no exceda de aquél en el que la mayoría de ovocitos han sido penetrados.

En un trabajo realizado por Abeydeera y Day (1997a), se evaluaron varios tiempos de cocultivo (3, 6, 9 y 12 h), comprobándose que la prolongación del cocultivo por encima de las 6 h no incrementaba la tasa de penetración (81% a las 6h vs 81% y 88% a las 9 y 12 h), pero sí la poliespermia (39% vs 59% y 70%, respectivamente). La coincubación por un periodo de 3 h dio una tasa de poliespermia muy adecuada (14%), pero se acompañó de una penetración excesivamente baja (31%).

La duración óptima del cocultivo de los ovocitos con el semen va a depender de las condiciones a las que sean sometidos los espermatozoides. Por ejemplo, los tratamientos de lavado, centrifugación o selección previos a la FIV (Matás *et al.*, 2002), así como las diferencias en la composición del medio de fecundación (Funahashi y Nagai, 2001), pueden dar lugar a variaciones en el estado de capacitación de los espermatozoides que, según Funahashi y Nagai (2001), podrían influir en el tiempo que precisan éstos para penetrar al ovocito. De modo que el tiempo óptimo de cocultivo va a depender de las características de cada estudio.

2.2.2.1.5. Sistema de cocultivo de espermatozoides-ovocitos

En un reciente trabajo, Grupen y Nottle (2000) propusieron una sencilla modificación en el sistema de cocultivo de los gametos durante la FIV, con la que lograron mayores tasas de penetración (80% vs 57%) y un incremento en el desarrollo hasta blastocisto (30% vs 8%), comparado con el sistema convencional. El protocolo de cocultivo convencional (control) consistía en la incubación de los ovocitos con los espermatozoides a una concentración constante de $0.5-1 \times 10^5$ spz/mL durante 5 h. En el sistema modificado, los ovocitos fueron expuestos a la misma concentración de espermatozoides que en el control durante 10 min y, a continuación, se transfirieron junto con los espermatozoides unidos a su superficie a una segunda gota con medio de FIV libre de espermatozoides, donde se incubaron durante 5 h más.

A mayor tiempo de exposición de los ovocitos con los espermatozoides a la concentración total, sería de esperar un incremento en la tasa de penetración; sin embargo, en este experimento ocurre lo contrario. Una posible explicación apuntada por Abeydeera (2002) es que, como en el sistema modificado los espermatozoides muertos o dañados se quedan en la primera gota, las especies reactivas del oxígeno generadas por su degradación, que dañarían a los ovocitos y los espermatozoides viables a lo largo de las 5 h de incubación, no les van a afectar.

2.2.2.1.6. Concentración de bicarbonato (HCO_3^-)

La mayoría de los medios de FIV contienen HCO_3^- , que actúa como tampón manteniendo un pH adecuado bajo la atmósfera de cultivo de 5% de CO_2 . Los niveles de bicarbonato son mayores en el tracto reproductivo de la hembra que en el eyaculado, lo que indica un posible papel de este ión en el proceso de capacitación *in vivo* (Harrison, 1996). El bicarbonato causa una pérdida de materiales presentes en la superficie del espermatozoide (Ashworth *et al.*, 1995) y alteraciones en la arquitectura de la membrana plasmática lipídica (Harrison *et al.*, 1996), que inducen el proceso de capacitación. Además, durante la capacitación *in vitro* en presencia de bicarbonato, muchas proteínas espermáticas se fosforilan (Flesch y Gadella, 2000).

El HCO_3^- estimula la enzima adenilato ciclasa de los espermatozoides mamíferos (Okamura *et al.*, 1985) y, por lo tanto, la producción de AMPc. El AMPc promueve la motilidad y la capacidad fecundante de los espermatozoides en muchas especies (Fraser y Monks, 1990); como en la bovina mediante un incremento del pH intracelular (Vijayaraghavan *et al.*, 1985). Además, el bicarbonato desempeña un papel importante en la hiperactivación de los espermatozoides de ratón (Neill y Olds-Clarke, 1987), cobaya (Bhattacharyya y Yanagimachi, 1988) y hámster (Boatman y Robbins, 1991). En los espermatozoides de hámster, el HCO_3^- estimula el movimiento hiperactivo, la capacitación y la reacción acrosómica (Boatman y Robbins, 1991). Se sabe que el bicarbonato puede estimular un flujo temprano y amplio de calcio hacia el citoplasma de los espermatozoides porcinos (Harrison *et al.*, 1993).

En el ratón, el bicarbonato es indispensable durante la FIV de ovocitos, pues en su ausencia la reacción acrosómica no tiene lugar (Lee y Storey, 1986), debido a un fallo en la entrada de calcio en el espermatozoide. A diferencia del ratón, los espermatozoides de cobaya son capaces de penetrar a los ovocitos en medios libres de bicarbonato en presencia de tampones orgánicos sintéticos, como Hepes, Tris o Mops, aunque no de manera tan eficiente como con el bicarbonato (Bhattacharyya y Yanagimachi, 1988); lo que hace suponer que, además de su papel como molécula tampón del pH, el bicarbonato desempeña otras funciones. En porcino, Suzuki *et al.* (1994a) no lograron obtener penetraciones al emplear Hepes y sugirieron que la presencia de bicarbonato debía ser necesaria para la FIV de ovocitos porcinos. Sin embargo, la penetración conseguida por Abeydeera y Day (1997a, 1997b) en medio TBM (*Tris-buffered Medium*), un medio tamponado con Tris y sin bicarbonato, contradice la idea del requerimiento universal de bicarbonato durante la FIV porcina.

Según Umbreit (1957), es necesaria una concentración de 9,2 mM de bicarbonato en el medio para alcanzar un pH de 7,2 bajo atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C, como resultado del CO₂ disuelto. En los trabajos en los que se valoró la eficacia de los tampones orgánicos sintéticos en los medios de fecundación (Lee y Storey, 1986; Bhattacharyya y Yanagimachi, 1988; Forsdike y Fraser, 1996; Suzuki *et al.*, 1994a) la FIV se llevó a cabo a 37 ó 39°C en aire. Por el contrario, el estudio de Abeydeera y Day (1997b) se realizó en atmósfera de 5% de CO₂, sin que estos autores pudieran determinar si el éxito en la penetración se pudo o no deber a una posible producción de bicarbonato durante el cultivo bajo sus condiciones de trabajo.

Abeydeera *et al.* (1997) evaluaron el efecto del aumento de la concentración de NaHCO₃ (26-56 mM) y del tiempo de incubación de los espermatozoides porcinos con NaHCO₃ sobre su capacitación y reacción acrosómica (valorada mediante tinción con clortetraciclina), observando un efecto estimulador sobre estos parámetros tanto al incrementar la dosis como el tiempo. El incremento en la motilidad, capacitación y reacción acrosómica espontánea de los espermatozoides porcinos incubados en un medio rico en HCO₃⁻ podría estar promovido, según lo expuesto anteriormente, por cambios en el pH, en el nivel de Ca²⁺ y/o de AMPc que tengan lugar en el citoplasma de estos espermatozoides (Abeydeera *et al.*, 1997).

2.2.2.1.7. Concentración de sodio (Na^+)

Según Fraser *et al.* (1993), la capacitación y la reacción acrosómica en los espermatozoides de ratón requiere una concentración de Na^+ superior a 125 mM. El sodio extracelular también se necesita en la reacción acrosómica de los cobayas (Hyne, 1984).

En el estudio de Abeydeera *et al.* (1997) que comentamos en el apartado anterior, la adición de bicarbonato sódico (NaHCO_3) para incrementar la concentración del ión HCO_3^- , también aumentó la concentración del ión Na^+ de 116,4 mM en el medio de fecundación con 26 mM de NaHCO_3 (control) a 126,4, 136,4 y 146,4 mM en los medios con 36, 46 y 56 mM de NaHCO_3 . Por lo que el incremento en los niveles de capacitación y reacción acrosómica que experimentaron los espermatozoides de verraco, al elevarse la concentración de NaHCO_3 , no podría ser totalmente atribuido al cambio en la concentración de ión bicarbonato del medio.

2.2.2.1.8. Concentración de calcio (Ca^{2+})

Aunque hay varios iones implicados en la modulación de la función espermática, parece ser que el calcio es el que juega el papel más crítico (Fraser, 1995), siendo indispensable para que se produzca la fecundación en mamíferos (Iwamatsu y Chang, 1971). La presencia de calcio extracelular es necesaria para que los espermatozoides se capaciten y adquieran la capacidad de sufrir la reacción acrosómica (Flesch y Gadella, 2000). Además, el calcio va a desempeñar otro papel muy importante durante la FIV, pues es necesario en la activación del ovocito que dará lugar a la exocitosis del contenido de los gránulos corticales y al bloqueo de la poliespermia. De hecho, la penetración *in vitro* no tiene lugar en ausencia de calcio, y su tasa se incrementa a medida que se aumentan los niveles de calcio (Abeydeera y Day, 1997b).

En un estudio realizado por Abeydeera y Day (1997b), se evaluó el efecto de varias concentraciones de Ca^{2+} (0,5, 2,5, 5, 7,5 y 10 mM) en el medio de fecundación TBMm sobre los parámetros de fecundación. Con la concentración de 0,5 mM no se logró penetración, mientras que de 2,5 a 10 mM tanto la penetración como la poliespermia se

incrementaron proporcionalmente a la cantidad de calcio, sugiriendo que las concentraciones altas de Ca^{2+} estimulaban la capacitación y/o la reacción acrosómica.

Por otra parte, no hay que olvidar el efecto que pueden ejercer otros componentes del medio de FIV sobre los iones de Ca^{2+} . Como hemos visto en el apartado 2.2.2.1.7, el bicarbonato puede estimular el flujo de calcio hacia el interior de los espermatozoides porcinos (Harrison *et al.*, 1993). Por el contrario, la presencia de FCS en el medio, debido a sus propiedades de unión, va a reducir la disponibilidad de Ca^{2+} extracelular (Cran y Cheng, 1986).

2.2.2.1.9. Medios de fecundación *in vitro*

En la FIV de ovocitos porcinos se han empleado diferentes medios de fecundación, según el equipo de trabajo y/o el propósito del estudio; siendo los más utilizados el medio TCM-199 (Tissue Culture Medium; Yoshida *et al.*, 1990; Funahashi *et al.*, 1994a; Nagai y Moor, 1990; Funahashi y Day, 1993b), el medio BO (Brackett and Oliphant Medium; Wang *et al.*, 1995; Kikuchi *et al.*, 1993; Nagai *et al.*, 1988), la solución KRBm (Krebs Ringer Bicarbonato modificada) (Naito *et al.*, 1988), el medio TBM modificado (Tris-buffered Medium; Abeydeera y Day, 1997a, 1997b) y el medio TALP modificado (Tyrode-albumin-lactate-piruvate Medium; Rath *et al.*, 1999). Es difícil establecer una comparación entre los medios de fecundación según los resultados obtenidos en diversos trabajos, pues los protocolos empleados por cada equipo nunca son exactamente iguales. Asimismo, las variaciones en la composición de los medios afectan a más de un componente, por lo que las diferencias en los resultados no pueden ser atribuidas a un solo factor.

Comparado con los medios TCM199, BO o la solución KRBm, el medio TBMm (Abeydeera y Day, 1997a) contiene una mayor concentración de Ca^{2+} (7.5 mM) y no presenta iones bicarbonato, entre otras diferencias. En dos estudios diferentes, la misma concentración de Ca^{2+} añadida al medio BO (Mori *et al.*, 1996) o al TBMm (Abeydeera y Day, 1997b) tuvo un comportamiento diferente sobre la penetración y poliespermia. Al utilizar el medio BO (Mori *et al.*, 1996), la mayor tasa de penetración se alcanzó con 1,125 y 2,25 mM de CaCl_2 , aumentando también la poliespermia en el segundo caso; mientras

que al elevar la concentración de CaCl_2 a 4,5 mM, se redujo tanto la tasa de penetración como la de poliespermia. Sin embargo, al emplear el medio TBMm (Abeydeera y Day, 1997b), el porcentaje de penetración y de poliespermia aumentó a la vez que se incrementó la concentración de CaCl_2 , siendo máximas para 7,5 y 10 mM de CaCl_2 . Además de la diferente composición en calcio y bicarbonato entre el medio BO y el TBMm, otros factores diferenciales en cada uno de los trabajos fueron el pH del medio de FIV (7,6 vs 7,2-7,3), el tiempo de cocultivo de ovocitos y espermatozoides (4 vs 12 h), la concentración espermática (5×10^4 vs 1×10^6 spz/mL) y la fuente de espermatozoides (fresco vs congelado). Estas diferencias en la metodología han podido contribuir en las variaciones obtenidas en los resultados. Esto es sólo un ejemplo de la gran variabilidad que existe en los protocolos de FIV empleados por cada equipo y para cada estudio, que hace muy difícil su comparación.

Por otra parte, Rath *et al.* (1999) estudiaron el efecto de dos medios modificados respecto al TALP, que se diferenciaban en que el primero contenía CaCl_2 como fuente de calcio, mientras que el segundo presentaba lactato cálcico; en que el contenido de NaH_2PO_4 en el segundo era un 24% superior que en el primero; y en el empleo de dos antibióticos diferentes: kanamicina y amikacina. Con el segundo medio modificado se obtuvo una tasa de división mayor (43% vs 18%), y se sugirió que la presencia de una mayor concentración de fosfato junto con la disponibilidad de calcio podían ser los responsables de la mejora.

Lo descrito anteriormente hace suponer, en relación con el medio de FIV empleado, que la fecundación de los ovocitos porcinos va a depender no sólo de cada uno de los componentes que constituyen el medio en cuestión, sino también de la interrelación entre ellos.

2.2.2.1.10. Suplementos del medio de fecundación

2.2.2.1.10.1. Suplementos macromoleculares

La mayoría de medios de FIV porcina se enriquecen con FCS (Wang *et al.*, 1991) o BSA (Abeydeera y Day, 1997b) como fuente proteica; pero también se ha probado, bajo

condiciones definidas, la complementación con polivinilalcohol (PVA) (Wang *et al.*, 1995) o polivinilpirrolidona (PVP) (Suzuki *et al.*, 1994b). Suzuki *et al.* (1994b) compararon diferentes suplementos en el medio de FIV: BSA, FCS, PVP y PVA; y demostraron que el tipo de macromolécula añadida ejercía una influencia significativa sobre la penetración espermática. La tasa más alta de penetración se obtuvo al añadir BSA (77%), seguida por el enriquecimiento con FCS (57%), aunque en ambos casos la poliespermia fue muy elevada (82% y 79%, respectivamente). En cambio, la penetración conseguida al añadir PVP (27%) y PVA (19%) fue especialmente baja.

Asimismo, la cantidad de BSA o FCS añadida al medio de FIV puede también afectar a las tasas de penetración (Abeydeera, 2001). En el ratón, el grado de la capacitación espermática varía según la concentración de BSA presente en el medio de fecundación (Fraser, 1985; Ward y Storey, 1984). Abeydeera y Day (1997b) evaluaron el efecto del enriquecimiento del medio de fecundación TBMm con 0,1% ó 0,4% de BSA sobre la fecundación de ovocitos porcinos, sin encontrar diferencias ni en la tasa de penetración ni en la de poliespermia, que en ambos casos fue muy elevada. Sin embargo, el número medio de espermatozoides por ovocito penetrado fue mucho mayor con 0,4% comparado con 0,1% (7,2 vs 3,8); lo que hizo suponer que, en presencia de una concentración más elevada de BSA, se capacitase un mayor número de espermatozoides, lo que facilitaría la entrada de más espermatozoides en el ovocito.

Respecto al FCS, Cran y Cheng (1986) observaron que la reacción cortical en ovocitos porcinos podía ser inducida con un ionóforo de calcio en un medio que contenía 1,8 mM de Ca^{2+} en ausencia de FCS; mientras que en presencia de FCS, la dispersión del contenido de los gránulos corticales dependía de la concentración extracelular de calcio. Estos autores sugirieron que debido a las propiedades de unión del FCS, en su presencia se reducía la disponibilidad de calcio extracelular del medio, de modo que la reacción cortical en el ovocito podía interrumpirse, lo que favorecería la poliespermia.

2.2.2.1.10.2. Cafeína, adenosina y péptido promotor de la fecundación (FPP)

La cafeína es un inhibidor de la fosfodiesterasa, por lo que puede incrementar los niveles de AMPc en los espermatozoides, estimulando su motilidad y capacitación (Flesch y Gadella, 2000). Se sabe que la cafeína es capaz de mejorar y prolongar la motilidad de los espermatozoides de toro (Garbers *et al.*, 1971) y verraco (Garbers *et al.*, 1973), así como de estimular la capacitación de los espermatozoides y la penetración al estar presente durante la FIV de ovocitos bovinos (Niwa y Ohgoda, 1988) y porcinos (Wang *et al.*, 1991) con semen congelado. La capacidad de estimular la capacitación espermática de la cafeína ha sido demostrada mediante el análisis con clortetraciclina (Fraser *et al.*, 1995).

En porcino, la mayoría de los medios de fecundación se complementan con cafeína. En principio, parecía ser que en ausencia de cafeína (Wang *et al.*, 1991) o incluso con concentraciones de 2 mM de cafeína (Nagai *et al.*, 1994) no se producía la penetración espermática. Pero en estudios más recientes (Abeydeera y Day, 1997b; Funahashi *et al.*, 2000b) se demostró que sin cafeína se llegaban a alcanzar tasas de penetración del 50%, aunque la adición de cafeína incrementaba estas tasas.

En un estudio realizado por Funahashi *et al.*, (2000a) utilizando semen fresco, se observó que tanto la adenosina como el péptido promotor de la fecundación (FPP) eran capaces de estimular la capacitación espermática *in vitro* e inhibir la pérdida espontánea del acrosoma; y se sugirió la posibilidad de que estos compuestos actuaran estimulando la ruta de la adenilato ciclasa/AMPc en los espermatozoides de verraco. Estos mismos autores compararon el efecto de la adición de cafeína, adenosina o FPP en el medio de FIV sobre los parámetros relativos a la fecundación de ovocitos MIV. La penetración fue mayor en el medio complementado con cafeína pero, en cambio, la mayoría de las penetraciones fueron poliespéricas en presencia de cafeína (87%), comparado con la adenosina (21%) o el FPP (25%) (Funahashi *et al.*, 2000b).

Recientemente, Funahashi y Nagai (2001) examinaron el efecto de la cafeína y la adenosina sobre la función espermática y sobre la FIV con semen de verraco congelado-descongelado. Tanto la cafeína como la adenosina estimularon la capacitación, pero sólo la

adenosina inhibió la reacción acrosómica espontánea, al igual que sucedió en el experimento con semen fresco. Tras la FIV, la penetración se incrementó en presencia de cafeína y de adenosina, pero la poliespermia aumentó notablemente sólo en el caso de la cafeína (92% vs 24,6%). Se sugirió que la baja incidencia de poliespermia en presencia de adenosina, tanto con semen fresco o congelado, podía deberse a su capacidad de estimulación de la capacitación, inhibiendo a la vez las reacciones acrosómicas espontáneas (Funahashi *et al.*, 2000a, 2000b; Funahashi y Nagai, 2001), a diferencia de la cafeína que estimula tanto la capacitación como la reacción acrosómica espontánea. Por lo tanto, la sustitución de la cafeína por adenosina podría ser una vía de solución para aliviar el problema de la poliespermia.

2.2.2.1.10.3. Ácido hialurónico

El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano producido por los COCs durante el proceso de maduración (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1997), y además está presente en el fluido oviductal porcino peri- y post-ovulatorio (Tienthai *et al.*, 2000); lo que sugiere un posible papel del ácido hialurónico durante el proceso de fecundación y/o desarrollo embrionario (Miyano *et al.*, 1994).

Se sabe que el ácido hialurónico estimula la capacitación espermática *in vitro* sin inducir la reacción acrosómica (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1997, 1998a). Recientemente, Suzuki *et al.* (1999, 2000) han observado un efecto positivo sobre la proporción de penetraciones monospermas, al añadir ácido hialurónico durante la preincubación espermática o el cocultivo de espermatozoides y ovocitos. Según esto, el ácido hialurónico podría también estar involucrado en la modulación de la penetración espermática y la poliespermia.

2.2.2.1.10.4. Glutación (GSH)

Boquest *et al.* (1999) observaron un mayor desarrollo a blastocisto cuando el medio de FIV contenía GSH a concentraciones de 0,125 mM (36%) y 0,25 mM (34%), comparado con la no adición (19%). Sin embargo, este incremento en la producción de blastocistos no dió lugar a un aumento en la concentración intracelular de GSH de los

zigotos. Por otra parte la adición de GSH en el medio de FIV a concentraciones de 0,5 mM (Boquest *et al.*, 1999) ó 0,98 mM (Jeong y Yang, 2001), afectó negativamente el desarrollo de los embriones. Por tanto, se podría concluir que la presencia de GSH en el medio de FIV tiene un efecto beneficioso sobre el desarrollo embrionario a determinadas concentraciones, superadas las cuales, es perjudicial.

La presencia de altas concentraciones de ácidos grasos insaturados en su membrana plasmática unido a su limitado citoplasma, hacen al espermatozoide especialmente sensible al daño oxidativo (Aitken, 1994). Se desconoce el mecanismo por el que la presencia de GSH durante la FIV mejora el desarrollo embrionario, pero se sabe que el GSH extracelular previene la peroxidación lipídica de las membranas celulares ocasionada por los radicales libres de oxígeno (Avissar *et al.*, 1989), incluidas las de los espermatozoides (Álvarez y Story, 1984).

Los espermatozoides, de forma natural, generan cantidades moderadas de especies reactivas del oxígeno como subproductos de su metabolismo (Hammerstedt, 1993); pero además, en condiciones *in vitro* los espermatozoides muertos o dañados van a producir estos productos de degradación a niveles excesivamente elevados (Abeydeera, 2002). El GSH presente en el medio de FIV podría actuar protegiendo a los espermatozoides y ovocitos contra el efecto tóxico de las especies reactivas del oxígeno.

2.2.2.1.10.5. Fluido oviductal, células oviductales y glicoproteína específica del oviducto porcino (pOSP)

Muchos estudios (Nagai y Moor, 1990; Kim *et al.*, 1996; Kano *et al.*, 1994; Bureau *et al.*, 2000) han demostrado el efecto beneficioso del fluido oviductal porcino de hembras en día 20-21 del estro, de las células oviductales procedentes de hembras prepúberes o en estro, y de los medios acondicionados derivados del cultivo de células oviductales, sobre la disminución de la poliespermia; lo cual sugiere que las secreciones del oviducto contienen algún factor que interacciona con los ovocitos y/o los espermatozoides, previniendo la poliespermia.

El efecto de las secreciones oviductales sobre el ovocito ya se comentó en el apartado 2.2.1.3.9. En referencia a su efecto sobre los espermatozoides, se ha identificado que los polímeros sulfatados, como dextran sulfato, fucoidan, polivinilsulfato y heparina, compiten con la glicoproteína ZP3 de la zona pelúcida de los ovocitos en su unión a los receptores de zona presentes en la superficie de los espermatozoides porcinos, e inducen la reacción acrosómica al unirse a ellos (Jones, 1991; Parry *et al.*, 1992). Por lo tanto, los compuestos sulfatados presentes en el fluido oviductal y folicular podrían unirse a los espermatozoides y estimular la reacción acrosómica, compitiendo de este modo con la ZP3 de los ovocitos y reduciendo el número de espermatozoides capacitados disponibles para unirse a la superficie del ovocito. Esto podría explicar la reducción de la poliespermia en presencia de secreciones del oviducto.

La exposición de los ovocitos a la pOSP (glicoproteína específica del oviducto porcino) antes y durante la FIV, provocó una notable reducción de la poliespermia respecto al control (29% vs 61%) y una disminución de la unión de espermatozoides a la ZP, sin que la penetración se viese comprometida (Kouba *et al.*, 2000). Este tratamiento también mejoró el desarrollo a blastocisto de los embriones MIV-FIV. Pero, como se expuso anteriormente, al haber estado tanto los ovocitos como los espermatozoides en contacto con la pOSP, no se pudo determinar si el efecto beneficioso de la glicoproteína se ejercía sobre el ovocito y/o sobre los espermatozoides. En un reciente estudio (McCauley *et al.*, 2001) en el que sólo los ovocitos fueron expuestos a la pOSP, también se logró reducir la poliespermia. Quedaría por determinar en estudios futuros, si la pOSP ejerce, de algún modo, una acción positiva sobre el espermatozoide.

2.2.2.1.11. Presencia de células del cúmulus durante la fecundación *in vitro*

Los ovocitos porcinos son madurados *in vitro* en presencia de células del cúmulus. Sin embargo, hay autores que mantienen las células del cúmulus durante la FIV (Yoshida *et al.*, 1993b; Sawai *et al.*, 1997), mientras que otros desnudan los ovocitos previamente al cocultivo con los espermatozoides (Abeydeera y Day, 1997b; Abeydeera *et al.*, 1998b; Boquest *et al.*, 1999).

En una revisión realizada por Romar (2001) sobre el efecto de las células del cúmulus durante la FIV, la mayoría de los autores coincidían en que los ovocitos rodeados por células del cúmulus presentaban una tasa más elevada de penetración y un mayor número de espermatozoides por ovocito que los desnudos. Mattioli *et al.* (1988a, 1988b) detectaron ciertas proteínas en los COCs maduros que podrían inducir la reacción acrosómica en espermatozoides de verraco. Además el cúmulus es muy rico en ácido hialurónico, que como hemos visto, favorece la capacitación. Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se realizó cultivo embrionario, por lo que se desconocía el efecto sobre el desarrollo embrionario de los ovocitos fecundados con o sin células del cúmulus.

En un trabajo realizado sobre ovocitos bovinos (Zang *et al.*, 1995) para valorar el efecto de la presencia de células del cúmulus durante la FIV, se observó una mejora en el desarrollo embrionario de aquellos ovocitos que habían sido fecundados en su presencia. Recientemente, Jeong y Yang (2001) han comparado el efecto de la presencia o retirada de las células del cúmulus durante la FIV porcina sobre el desarrollo embrionario. A diferencia del bovino, en el caso del porcino no se observaron diferencias significativas ni en la tasa de división (78% vs 65%) ni en el desarrollo hasta blastocisto (16% vs 14%), en presencia o ausencia de células del cúmulus.

2.2.2.1.12. Selección de espermatozoides con Percoll®

En un reciente estudio llevado a cabo por Jeong y Yang (2001), la selección de espermatozoides vivos por centrifugación en gradientes de densidad de percoll (45% / 90%, v/v) a 900 g durante 15 min en semen congelado-descongelado, mejoró la división (85% vs 57%) y el desarrollo hasta estadio de blastocisto (24% vs 6%) tras la FIV, comparado con la no selección por percoll. Además, la adición de GSH al gradiente de percoll incrementó todavía más la tasa de desarrollo a blastocisto (30% vs 20% sin GSH) (Jeong y Yang, 2001).

En el proceso de selección, los espermatozoides muertos o dañados son eliminados; de modo que se elimina de la gota de fecundación la población de espermatozoides responsable de generar una mayor cantidad de especies reactivas del oxígeno, atenuando el efecto tóxico producido por estas sustancias sobre los espermatozoides y ovocitos durante

la FIV. Es posible este efecto protector sea el responsable de la mejora obtenida en el desarrollo embrionario al seleccionar los espermatozoides con percoll.

En un trabajo realizado por Matás *et al.* (2002) en el que se empleó el mismo gradiente de percoll (45% / 90%) y se centrifugó durante 30 min a 700 g, se incrementó la tasa de penetración, la poliespermia y el número de espermatozoides por ovocito penetrado, comparado con otros sistemas de preparación del semen previo a la FIV en los que no se empleó percoll. Estos autores sugirieron el posible efecto promotor del percoll sobre la capacitación espermática.

2.2.3. Cultivo de embriones

En los primeros estudios sobre cultivo *in vitro* (CE) de embriones porcinos, no se logró superar el estadio de 4 células a partir de embriones de una célula obtenidos *in vivo* (Davis, 1985). Este bloqueo en 4 células coincide con la transición del control genético de la madre al embrión (Jarrell *et al.*, 1991). Además, el estadio de 4 células se prolonga durante 24 h *in vivo*, y es la fase en la que se produce el paso de los embriones porcinos del oviducto al útero (Davis, 1985).

Posteriormente se consiguió superar el bloqueo en 4 células gracias al uso de oviductos de ratón en cultivo (Kriser *et al.*, 1989), al cocultivo con células epiteliales (Archibong *et al.*, 1989) o al enriquecimiento con fluido oviductal (Archibong *et al.*, 1989) durante el CE. En cambio, el cultivo *in vitro* de embriones recogidos de hembras donantes a partir del estadio de 4 células hasta blastocisto si se podía llevar a cabo en un medio de cultivo simple basado en el medio Krebs-Ringer bicarbonato (Davis, 1985), sin necesidad de cocultivo.

En estudios más recientes, más del 70% de los embriones porcinos obtenidos *in vivo* y cultivados *in vitro* se han desarrollado hasta el estadio de blastocisto en diferentes medios: medio Whitten's modificado (Beckmann y Day, 1993), medio NCSU23 (*North Carolina State University 23*; Petters y Wells, 1993), medio *Iowa State University* (Youngs *et al.*, 1993) y medio BECM-3 (*Beltsville Embryo Culture 3*; Dobrinsky *et al.*, 1996). Sin

embargo, al comparar la eficacia de estos medios para soportar el desarrollo embrionario de embriones MIV-FIV se encontró un amplio rango (desde 5% a 30%) en la proporción de blastocistos obtenida con cada uno de ellos (Abeydeera *et al.*, 1999a).

Por otra parte, la transferencia embrionaria de cigotos MIV-FIV al oviducto de hembras receptoras y su posterior recogida, por lavado retrógrado, 5 días más tarde dio lugar a blastocistos con un número de células notablemente más elevado (106-136 vs 10-21) que los controles cultivados *in vitro* (Funahashi *et al.*, 1994d). Asimismo, al cultivar *in vitro* e *in vivo* embriones de 1-2 células obtenidos *in vivo*, los blastocistos desarrollados *in vivo* también presentaban un mayor número de células (55 vs 25) que los cultivados *in vitro* (Machaty *et al.*, 1998).

Según Bavister (1995), el ambiente de cultivo utilizado para el desarrollo de los embriones preimplantacionales, incluso en ausencia de efectos visibles, puede afectar profundamente a los procesos que acontezcan tras la implantación. Asimismo, el cultivo *in vitro* afecta a la expresión génica de los embriones, tanto en estadios tempranos como avanzados del desarrollo, aunque sus efectos se observen a largo plazo (Duranthon y Renard, 2002). Incluso siendo compatible con el desarrollo a blastocisto, las modificaciones en la concentración salina del medio de cultivo pueden provocar importantes alteraciones en la expresión de determinados genes (Ho *et al.*, 1994). Del mismo modo, la adición al medio de cultivo de aminoácidos (Ho *et al.*, 1995), factores de crecimiento (Babalola y Schultz, 1995) o suero (Wrenzycki *et al.*, 1999) puede afectar a la transcripción génica materna y embrionaria. En general, el desarrollo de los embriones en cultivo es más lento que *in vivo*, dando lugar a blastocistos con un menor número de células unido a una progresiva pérdida de viabilidad y a un metabolismo reducido (McKiernan y Bavister, 1994).

Según lo expuesto hasta este momento, se podría afirmar que el limitado desarrollo hasta blastocisto de los embriones porcinos MIV-FIV-CE y su menor calidad, comparada con los obtenidos *in vivo*, no se debe a un fallo puntual en el sistema de PIV de embriones, sino a la combinación de una maduración citoplasmática inadecuada o incompleta, una elevada poliespermia, una formulación inadecuada de los medios de cultivos y unas condiciones de cultivo embrionario subóptimas.

2.2.3.1. Condiciones del cultivo de embriones

2.2.3.1.1. Tensión de oxígeno

Las condiciones convencionales de incubación de los embriones durante el CE son las mismas que las empleadas para la MIV y la FIV, es decir, 5% de CO₂ en atmósfera saturada de humedad a una temperatura de 38,5-39°C.

Sin embargo, Berthelot y Terqui (1996) afirmaron que el desarrollo de embriones porcinos obtenidos *in vivo* y cultivados en NCSU23 modificado (sin glucosa pero enriquecido con lactato, piruvato, vitaminas y mayores niveles de glutamina, NaHCO₃ y BSA) a baja tensión de O₂ era óptimo. En contraste con estos resultados, Machaty *et al.*, (1998) no observaron mejora en el desarrollo hasta blastocisto al comparar el cultivo de embriones obtenidos *in vivo* en NCSU23 bajo tensión reducida (5%) de O₂ o en condiciones convencionales (20% O₂). No obstante, estos trabajos no son comparables, al haber diferencias en el medio de cultivo empleado.

Recientemente, Machaty *et al.* (2001) han observado un incremento en el desarrollo a blastocisto y en el número de células al cultivar mórulas MIV/FIV bajo tensión reducida (5%) de O₂. La explicación propuesta para esta mejora es que la inhibición parcial de la fosforilación oxidativa a partir del estadio de mórula tiene efectos beneficiosos sobre el desarrollo y el número de células de los blastocistos. Fischer y Bavister (1993) indicaron que el nivel de O₂ en la cavidad uterina era menor que en el oviducto. Esta menor tensión de oxígeno podría ser en parte responsable del cambio en la vía de producción de ATP (adenosil trifosfato) de fosforilación oxidativa a glicólisis en el momento de la compactación/blastulación. Como en condiciones *in vivo*, los embriones porcinos alcanzan los cuernos uterinos antes del estadio de mórula compacta (Davis, 1985), podríamos pensar que una reducción en la fosforilación oxidativa en beneficio de la glicólisis sería positiva en el estadio de peri-compactación.

Se ha propuesto el establecimiento de un CE secuencial: en atmósfera convencional (20% O₂) hasta el estadio de mórula y a partir de ahí bajo tensión reducida (5%) de O₂.

2.2.3.1.2. Relación: embriones/volumen de medio

Se ha demostrado que el cultivo de embriones en volúmenes reducidos de medio o en grupos incrementa significativamente el desarrollo a blastocisto, así como el número de células de los blastocistos en varias especies: ratón (Paria y Dey, 1990), mujer (Lane y Gardner, 1992), vaca (Palma *et al.*, 1992) y oveja (Gardner *et al.*, 1994). Además, el cultivo de embriones en volúmenes reducidos aumenta la viabilidad del embrión tras la transferencia embrionaria (Lane y Gardner, 1992). Asimismo, la disminución de la relación volumen de cultivo/embrión estimula el desarrollo de la masa celular interna de los blastocistos sin afectar el número de células del trofoblasto, en embriones de ratón (Gardner *et al.*, 1997) y vaca (Ahern y Gardner, 1998). Sin embargo en un estudio reciente realizado sobre embriones humanos (Rijnders y Jansen, 1999), no se observó ninguna mejora en el desarrollo embrionario al cultivar en grupo o al reducir el volumen de cultivo.

En el porcino, los estudios en los que se valoró el efecto del volumen de cultivo sobre el desarrollo de los embriones se realizaron hace más de dos décadas. En el más reciente, de 1982 (Menino y Wright, 1982), se comparó el efecto de dos sistemas de cultivo: en microgota de 50 μ L en placas de Petri de cristal y en 4 mL en tubos Falcon de plástico, con unos 28-29 embriones por placa o tubo, sobre el desarrollo de embriones de 1 célula obtenidos *in vivo*; alcanzándose un mayor índice de divisiones completadas en cultivo con el sistema de 4 mL de medio, aunque sin apreciarse diferencias significativas en el porcentaje de mórulas y de blastocistos entre los dos sistemas. Mientras que en dos estudios previos (Pope y Day, 1977; Davis y Day, 1978), el desarrollo embrionario de embriones de 1 célula obtenidos *in vivo* fue superior en los cultivados en microgotas frente al cultivo en tubos.

Una de las hipótesis propuestas para el efecto beneficioso del cultivo en grupo y/o en pequeño volumen de medio es la producción de factores autocrinos y/o paracrinos por parte del embrión en cultivo (Paria y Dey, 1990; O'Neill, 1998), que estimularían el desarrollo del propio embrión que los genera y el de los embriones vecinos. Según esto, el cultivo en volúmenes grandes daría lugar a la dilución de los factores beneficiosos producidos por el embrión, de tal modo que la concentración presente en el medio de cultivo no sería suficiente para ejercer el efecto (Gardner, 1994).

Entre los posibles factores autocrinos y/o paracrinos implicados se han descrito los siguientes: factores con propiedades mitogénicas o de diferenciación, como los factores de crecimiento PDGF (*Platelet-derived Growth Factor*) (Thibordeaux *et al.*, 1995) e IGF II (*Insulin-like Growth Factor II*) (O'Neill, 1997); y factores anti-apoptóticos o de supervivencia, como el TGF β (*Transforming Growth Factor β*) (Brison y Schultz, 1997) y el PAF (*Platelet-activating Factor*) (O'Neill, 1998), los cuales actuarían reduciendo los niveles de apoptosis dentro de la masa celular interna del embrión (Colon y Raff, 1999).

Paria y Dey (1990) sugirieron que el efecto de estos factores de crecimiento o de supervivencia producidos por el embrión de ratón empezaba a ser operativo a partir del estadio de 8 células o mórula, momento en el que comienzan a detectarse en la superficie del embrión receptores para el factor de crecimiento epidérmico (EGF); mientras que, recientemente, O'Neill (1998) ha propuesto que los factores de supervivencia autocrinos sólo son requeridos por el embrión de ratón antes o durante el estadio de 2 células.

Otra de las hipótesis, ofrecida por Bavister (1995), es que el incremento en el número de embriones por unidad de volumen podría resultar beneficioso debido, simplemente, a un agotamiento por parte de los propios embriones de sustancias embriotóxicas o inhibitoras en el medio, o por una disminución en la pérdida de compuestos endógenos importantes, como aminoácidos, entre otras posibilidades. Según este autor, el efecto del tamaño de la gota de cultivo sobre el desarrollo embrionario va a depender, entre otros factores, de la composición del medio de cultivo y de las condiciones físicas empleadas.

Para apoyar esta hipótesis, Bavister comparó dos trabajos en los que se estudió el efecto del número de embriones por unidad de volumen, en embriones de hámster. En uno de ellos (Schini y Bavister, 1988), al aumentar el número de embriones por microlitro de medio de 0,24 a 35 se incrementó ampliamente el porcentaje de embriones de 2 células que se dividieron al menos una vez (de 1% a 34%). El medio de cultivo empleado contenía glucosa y fosfato, que bloquean el desarrollo de los embriones de hámster en cultivo; lo cual hace pensar que la mejora se debió, en parte, a un consumo de estos compuestos por los embriones, que redujo su concentración en el medio. En cambio, en el otro trabajo descrito (McKiernan y Bavister, 1994) se empleó un medio sin glucosa ni fosfato, no

encontrándose diferencias en el desarrollo a mórula y a blastocisto al cultivar 2, 4 u 8 embriones por gota de medio.

2.2.3.2. Medios de cultivo de embriones

Como hemos visto, el desarrollo hasta el estadio de blastocisto de embriones obtenidos *in vivo* se logró con éxito (>70%) en varios medios de cultivo. Sin embargo, al comparar la eficacia de estos medios sobre el CE de embriones MIV-FIV, se observó un amplio rango de resultados (Abeydeera *et al.*, 1999a). El medio con el que se obtuvo el mejor desarrollo embrionario fue el NSCU23 (30% de blastocistos) seguido por el medio Iowa State University (14%) y el BECM-3 (12%), siendo el medio Whitten el que dio peores resultados (5%). Se puede afirmar que, hasta la fecha, el NSCU23 es el medio de elección para el cultivo de embriones MIV-FIV, mientras que para el cultivo de embriones obtenidos *in vivo* también son adecuados los otros 3 medios citados.

De todos modos, la capacidad de los embriones de desarrollarse en un medio de cultivo determinado no indica necesariamente que este medio le proporcione un ambiente beneficioso o deseable; sino que podría reflejar simplemente su capacidad para tolerar las condiciones artificiales, quizás a expensas de su viabilidad (Bavister, 1995). Por lo tanto, el diseño del medio de cultivo es crucial para el posterior desarrollo embrionario pre- y postimplantacional. En la actualidad hay dos tendencias a la hora de formular los medios de cultivo: una tendencia más pragmática, cuyo principal objetivo es la producción de embriones viables, que puede emplear medios de cultivo no definidos para este fin; y otra tendencia, cuya meta es el conocimiento de los requerimientos básicos de los embriones en cultivo, para lo cual es fundamental el empleo de medios cuya composición esté totalmente definida (Bavister, 1995).

2.2.3.3. Composición de los medios de cultivo de embriones

2.2.3.3.1. Fuente energética

El diseño del medio de cultivo óptimo debería ser, en principio, aquél que imitara, en la medida de lo posible, las condiciones ambientales a las que está sometido el embrión

in vivo; con el fin de promover una actividad metabólica normal y un desarrollo máximo del embrión *in vitro* (Gandhi *et al.*, 2001). Comparado con otras especies, en el porcino no se ha progresado mucho en el análisis del metabolismo embrionario y del desarrollo de medios de cultivo más apropiados (Gandhi *et al.*, 2001).

Se conoce la concentración de piruvato (0,21 mM), lactato (5,71 mM) y glucosa (0,59 mM) en el oviducto porcino (Nichol *et al.*, 1992), que parece estar controlada por mecanismos sistémicos (Nichol *et al.*, 1998). Estos valores difieren mucho de los presentes en el medio NCSU23: 0 mM de piruvato, 0 mM de lactato y 5,5 mM de glucosa. Sin embargo, el NCSU23 es el medio empleado en la mayoría de sistemas de PIV de embriones porcinos, pues es el que da mejores resultados en términos de desarrollo a blastocisto; a pesar de haberse diseñado hace más de 10 años (Petters y Reed, 1991), momento en el que se conocía muy poco sobre las necesidades metabólicas del embrión porcino. El éxito en el desarrollo embrionario con el medio NCSU23, a pesar de sus diferencias respecto a las condiciones *in vivo*, nos muestra la capacidad de adaptación de los embriones a los sustratos energéticos a los que son expuestos en condiciones *in vitro* vs *in vivo*.

Respecto al metabolismo energético del embrión de ratón, vaca y oveja, el proceso de producción de ATP es un regulador clave para el desarrollo *in vitro* de los embriones (Thompson, 2000). Durante las etapas previas a la compactación, el desarrollo del embrión depende de la fosforilación oxidativa de ácidos carboxílicos (principalmente el piruvato) para la obtención de ATP, mientras que la glucosa es pobremente utilizada; sin embargo, durante la compactación y blastulación, se produce un incremento en la producción de ATP mediante glicolisis, lo que origina un aumento significativo en la utilización de la glucosa (Thompson *et al.*, 2000). En general, la producción de ATP es baja durante las primeras fases de división, ya que las demandas no son altas; y aumenta tras la compactación, respondiendo a un incremento en las necesidades por parte del embrión.

Se sabe que la concentración de glucosa en las secreciones oviductales porcinas disminuye dramáticamente en el momento en que los embriones están presentes en el oviducto (Nichol *et al.*, 1992). Al igual que ocurre en otras especies, en el porcino se incrementa en cuatro veces la captación de glucosa en los estadios de mórula y blastocisto

(Krisher *et al.*, 2000). Sin embargo, en un reciente estudio llevado a cabo por Gandhi *et al.* (2001), se observó un aumento en el consumo de glucosa en el estadio de 2 células en embriones porcinos cultivados en el medio de cultivo secuencial Gardner's G1.2/G2.2; lo que indicaría que en esa fase la glicólisis u otra ruta de utilización de la glucosa se encuentra más activa, y que la glucosa sí desempeña un papel en los embriones porcinos en las primeras fases de división. Aunque en este mismo estudio, al utilizar el medio NCSU23, los embriones consumían menos glucosa en los estadios de 2 a 8 células que en los de mórula y blastocisto, como ocurre en otras especies.

Además, se ha comprobado que la glucosa y/o la glutamina, como fuentes únicas de energía, pueden soportar el desarrollo *in vitro* de cigotos porcinos obtenidos *in vivo* hasta blastocisto; lo que indica que las rutas de utilización de la glucosa están activas durante todo el desarrollo (Petters *et al.*, 1990). No obstante, también en el porcino la actividad del ciclo de Krebs y la glicólisis se incrementan significativamente en los estadios de mórula y blastocisto (Flood y Wiebold, 1988). La glucosa, además de ser un sustrato energético, desempeña otras funciones, como la producción de ribosa y NADPH a través de la ruta pentosa-fosfato; siendo la síntesis de ribosa importante para el embrión, al ser un precursor en la síntesis de ADN y ARN.

Abeydeera (2002) ha propuesto la utilización de un cultivo secuencial, piruvato y lactato como sustratos energéticos durante las primeras 72 h de cultivo, y glucosa a partir de ese momento.

Otras diferencias encontradas en los embriones porcinos preimplantacionales respecto a otras especies, es la abundancia de vesículas lipídicas intracelulares y la disposición de las mitocondrias en pequeños agregados íntimamente asociados a estas vesículas lipídicas, mientras que en otras especies las mitocondrias se distribuyen homogéneamente en el citoplasma (Smith y Alcivar, 1993). Esto podría indicar que el metabolismo mitocondrial de los embriones porcinos es único, por lo que sus requerimientos podrían también ser diferentes (Gandhi *et al.*, 2001).

Se han descrito una serie de interacciones entre componentes usuales en la fórmula de los medios de cultivo embrionario, que analizaremos a continuación:

- Piruvato y lactato:

En los primeros estudios sobre el desarrollo de embriones porcinos, se observó que el piruvato y el lactato, los sustratos energéticos preferidos durante las primeras fases de desarrollo *in vitro* en embriones de ratón, vaca u oveja, inhibían el desarrollo de los embriones porcinos (Davis y Day, 1978). Más tarde, se comprobó que el piruvato en ausencia de lactato no producía esta inhibición, mientras que sí lo hacía la combinación de ambos (Davis, 1985). Por el contrario, en estudios posteriores se han cultivado con éxito embriones porcinos en medios que contenían glucosa, lactato y piruvato (Beckmann y Day, 1991; Misener *et al.*, 1991); lo que sugiere que el lactato y el piruvato no son perjudiciales para el desarrollo embrionario en esta especie.

- Lactato y glucosa:

Como hemos visto, el desarrollo hasta blastocisto obtenido con el medio NCSU23 fue superior al logrado con el medio Whitten modificado (30% vs 5%). Una de las principales diferencias en su composición es la presencia de lactato sódico en el medio Whitten (25 mM en medio Whitten vs 0 mM en NCSU23). Por esta razón, Abeydeera *et al.* (1999a) probaron a reducir la concentración de lactato en el medio Whitten y a incrementarla en el NCSU23. Al incrementar los niveles de lactato en el NCSU23 de 0 a 6'25, 12'5 y 25 mM se observó una notable reducción del desarrollo a blastocisto con la concentración de 25 mM de lactato (14%) frente a 0 mM y 12,5 mM (29% y 34%). Sin embargo, al reducir en el medio Whitten los niveles de lactato de 25 mM a 0, 6'25 y 12'5 mM, las tasas de división (66% vs 2%) y de desarrollo a blastocisto (7% vs 0%) se vieron disminuidas. Ambos medios (Whitten y NCSU23) contienen niveles similares de glucosa.

Por otra parte, al comparar los medios de cultivo (*Iowa State University* y Whitten modificado), el desarrollo embrionario conseguido fue mayor en el *Iowa State University* frente al Whitten (14% vs 5% de blastocistos). A diferencia del medio Whitten, el medio *Iowa State University* tiene menores niveles de lactato (12,9 vs 25 mM) y no contiene

glucosa. Estos resultados sugieren que la combinación de lactato+glucosa en el mismo medio de cultivo resultan perjudiciales para el desarrollo de los embriones porcinos MIV-FIV.

- Glucosa y fosfato:

La glucosa, en combinación con fosfato inorgánico, inhibe el metabolismo oxidativo y el desarrollo en los primeros estadios de división de los embriones porcinos (Petters *et al.*, 1990) y de hámster (Seshahiri y Bavister, 1991b). En los embriones de hámster cultivados en un medio con glucosa, el fosfato conduce a un incremento en la glicólisis en detrimento de la fosforilación oxidativa. Este incremento en la actividad glicolítica se cree que puede tener un efecto inhibitorio sobre la respiración mitocondrial, lo que llevaría a un descenso en el consumo de oxígeno.

2.2.3.3.2. Fuentes proteicas: suero fetal bovino (FCS) y albúmina sérica bovina (BSA)

Las proteínas séricas están presentes en las secreciones uterinas de las cerdas (Murray *et al.*, 1972). El suero y sus componentes proporcionan al medio de cultivo ciertos factores, como sustratos energéticos, vitaminas, aminoácidos y factores de crecimiento (Bavister, 1995), importantes en la formación y eclosión de los blastocistos (Gardner *et al.*, 1994; Hochi *et al.*, 1994; Meyen *et al.*, 1989). Los aminoácidos presentes en el suero van a desempeñar un papel importante como fuente energética, osmorreguladores y estabilizadores del pH (Bavister, 1995). Sin embargo, el suero no sostiene el desarrollo de los embriones porcinos en los primeros estadios de división (1-2 células) (Koo *et al.*, 1997).

La albúmina sérica bovina (BSA), además de proporcionar al embrión factores similares a los mencionados para el suero, desempeña una importante función biológica; que consiste en secuestrar iones y pequeñas moléculas (Maurer, 1992), actuando como quelante de metales pesados u otras toxinas. Además, Pemble y Kaye (1986) han sugerido que la adición de proteínas como la BSA al medio de cultivo puede ser esencial, ya que el

embrión puede captarlas por endocitosis y romperlas, obteniendo sustratos energéticos y aminoácidos para sus procesos metabólicos y anabólicos.

Los requerimientos nutricionales del embrión, y entre ellos los de fuentes proteicas como la BSA o el suero (principalmente el FCS), no son iguales en los estadios de división que en los de diferenciación (mórula y blastocisto), como se ha demostrado en numerosos estudios (Gardner *et al.*, 1994; Hochi *et al.*, 1994; Meyen *et al.*, 1989; Robl y Davis, 1981). En un trabajo realizado por Dobrinsky *et al.* (1996) sobre embriones porcinos obtenidos *in vivo*, la exposición a FCS de los embriones en sus primeros estadios de desarrollo (de 2 a 8 células) fue perjudicial y disminuyó significativamente la formación y eclosión de blastocistos; mientras que al exponerlos a partir del estadio de mórula, el FCS resultó beneficioso para la formación y eclosión de los blastocistos. El efecto beneficioso del suero durante la diferenciación del embrión podría deberse a la acción de los factores de crecimiento (Schultz y Heyner, 1993) y de los aminoácidos (Spindle, 1980) presentes en su composición, unido a las propiedades antioxidantes del suero (Kan y Yamane, 1983), que protegen al embrión frente a las especies reactivas del oxígeno producidas durante el cultivo.

Según varios autores (Rosenkrans *et al.*, 1989; Robl y Davis, 1981), la eclosión de los embriones porcinos en cultivo sólo tiene lugar en presencia de suero. Sin embargo, Meyen *et al.* (1989) lograron que blastocistos porcinos eclosionaran en ausencia de suero, aunque en un menor porcentaje. El efecto estimulador del suero sobre la eclosión de los blastocistos podría deberse a que proporciona al embrión una fuente de plasminógeno que, al transformarse en plasmina, puede degradar proteolíticamente la zona pelúcida, como se ha observado en embriones bovinos (Kaaekuahiwi y Menino, 1990). No obstante, el significado de la eclosión *in vitro* y su relación con la capacidad de desarrollo del embrión no están todavía muy claro (Bavister, 1995).

Uno de los problemas que presenta la utilización de FCS o BSA, además de la falta de definición de los medios, es la variabilidad encontrada entre diversos lotes del mismo producto (Dobrinsky *et al.*, 1996) que, consiguientemente, ocasiona variabilidad en los resultados obtenidos según diferentes laboratorios o experimentos dentro del mismo laboratorio. Respecto a la BSA, se ha aconsejado el empleo de BSA libre de ácidos grasos

(BSA-FAF) en sustitución a la comúnmente utilizada BSA-fracción V (Bavister, 1995). La explicación es que la BSA-V puede contener determinados niveles de contaminantes (Maurer, 1992), como esteroides, vitaminas, ácidos grasos y colesterol, que actúen inhibiendo o estimulando la proliferación celular (Thomassen, 1989), y que van a variar entre lotes; mientras que los procesos de extracción a los que se someten las preparaciones de BSA-FAF podrían eliminar parcial o totalmente estos contaminantes (Dobrinsky *et al.*, 1996), colaborando a una mayor definición del producto.

Además de la variabilidad en los resultados, se han descrito varios efectos adversos sobre el desarrollo de los embriones cultivados en medio enriquecido con suero, como la formación precoz del blastocelo, el secuestro de lípidos, una ultraestructura mitocondrial anormal, perturbaciones en el metabolismo y el síndrome de sobrepeso al nacimiento, en ovino (Thompson *et al.*, 1995; Gardner *et al.*, 1994); así como modificaciones en el nivel de transcripción génica, en bovino (Wrenzycki *et al.*, 1999).

Con el fin de definir completamente los medios de cultivo se ha empleado un polímero sintético, el polivinilalcohol (PVA), como alternativa a la BSA (Keskintepe y Brackett, 1996), debido que presenta propiedades surfactantes similares a las de la BSA que facilitan la manipulación de los embriones (Bavister, 1981). Sin embargo, los embriones cultivados en presencia de PVA difieren bioquímicamente de aquéllos cultivados en presencia de BSA (Thompson *et al.*, 1998) y presentan una expresión alterada del ARNm de varios genes importantes para el desarrollo (Wrenzycki *et al.*, 1999).

Varios autores se han decantado por el empleo secuencial de BSA y FCS en el cultivo de embriones porcinos, utilizando BSA en las primeras fases de desarrollo, y sustituyéndola por FCS a partir del estadio de mórula o blastocisto. Así, Koo *et al.* (1997) y Lee *et al.* (2001) enriquecen el medio con BSA durante los 4 primeros días de cultivo y a partir de ahí, sustituyen por FCS; mientras que Dobrinsky *et al.* (1996) prolongan el cultivo con BSA durante 125 horas (5 días y 5 horas), momento en que la sustituyen por FCS.

2.2.3.3.3. Aminoácidos

Los ovocitos, los embriones, las secreciones oviductales y uterinas de los mamíferos se caracterizan por contener altas concentraciones de aminoácidos libres (Miller y Schultz, 1987; Kaye, 1986); en especial de alanina, aspartato, glicina, glutamato, glutamina y serina (Gardner, 1999). Además, los ovocitos y embriones poseen sistemas específicos de transporte de aminoácidos, siendo capaces de captarlos fácilmente del medio de cultivo y mantener sus reservas endógenas de aminoácidos (Gardner, 1999). Todo esto sugiere que los aminoácidos desempeñan un papel importante a lo largo del periodo de desarrollo preimplantacional de los embriones mamíferos.

Aunque las concentraciones de aminoácidos de las preparaciones comerciales no son las mismas que las encontradas en las secreciones oviductales y uterinas (Thompson, 2000), se demostró en varias especies de mamíferos, entre los que se encuentran el hámster, el ratón, el cerdo, la oveja y la vaca, que la adición de aminoácidos al medio de cultivo estimulaba el desarrollo de los embriones (Gardner *et al.*, 1994; Petters *et al.*, 1990; Schini y Bavister, 1988; Gardner y Lane, 1993; Gardner, 1994). Además, en el caso de los embriones de oveja, la viabilidad de los blastocistos cultivados con aminoácidos fue equivalente a la de los embriones desarrollados *in vivo* (Gardner *et al.*, 1994). En algunos casos, aunque no se detectó ningún efecto durante la fase de desarrollo preimplantacional, el desarrollo postimplantacional de los embriones que habían sido cultivados con aminoácidos mejoró sustancialmente (Spindle, 1980; Zhang y Armstrong, 1990; Mehta y Kiessling, 1990). Por otra parte, la inclusión rutinaria de BSA en los medios de cultivo puede ser que enmascare las necesidades de aminoácidos por parte de los embriones, pues como vimos anteriormente, los embriones pueden captar y degradar la BSA.

Entre las posibles funciones ejercidas por los aminoácidos sobre el desarrollo de los embriones se han descrito las siguientes: productores de energía, reguladores de la presión osmótica y/o el balance iónico, antioxidantes, quelantes de metales pesados, reguladores del pH intracelular y relacionados con la síntesis proteica (Bavister, 1995). Sin embargo, también se ha descrito que la adición al medio de cultivo de aminoácidos puede modificar el nivel de transcripción génica maternal y embrionaria (Ho *et al.*, 1995).

Según Bavister (1995), los aminoácidos pueden ser utilizados como sustratos energéticos en ciertos estadios del desarrollo embrionario y/o por embriones de determinadas especies. Se sabe que la glutamina contribuye a la producción de ATP (Rieger *et al.*, 1992) y, en el caso del porcino, puede reemplazar a la glucosa como única fuente de energía a lo largo de todo el desarrollo embrionario preimplantacional (Petters *et al.*, 1990). Ciertos aminoácidos, como la glicina y la glutamina, y compuestos relacionados, como la betaína, pueden proteger al embrión frente a choques osmóticos (Biggers *et al.*, 1993). Esta regulación de la presión osmótica parece estar relacionada con un incremento en la síntesis proteica (Anbari y Schultz, 1993). La glutamina tiene además la propiedad de proteger al embrión frente al daño oxidativo, ayudando a mantener los niveles intracelulares de cisteína (Bannai e Ishii, 1988).

Los iones metálicos pueden estimular la producción de radicales libres de oxígeno, que son altamente tóxicos para el embrión; por lo que a mayor contenido en metales pesados, mayor concentración de peróxido de hidrógeno en el medio de cultivo que, como consecuencia, va a soportar peor el desarrollo de los embriones (Goto *et al.*, 1993). Los aminoácidos, gracias a su poder quelante, son capaces de secuestrar iones metálicos y otras sustancias perjudiciales para el embrión, evitando que ejerzan su acción tóxica.

Por otra parte, los aminoácidos tienen la cualidad de captar protones que, unido a los elevados niveles de aminoácidos en el interior de los embriones, hace pensar en la posibilidad de que ciertos aminoácidos actúen como tampones del pH intracelular, uniéndose a iones H^+ y transportándolos hacia el exterior de la membrana celular (Bavister, 1995). Asimismo, la adición de aminoácidos al medio de cultivo incrementa las reservas de aminoácidos del embrión, por lo que se facilita la síntesis proteica en el embrión (Rosenkrans *et al.*, 1989).

Los aminoácidos, de manera individual, pueden ser estimulantes o inhibidores del desarrollo embrionario *in vitro*, hecho que va a variar según la especie animal, siendo en general la glutamina uno de los aminoácidos más beneficiosos (Carney y Bavister, 1987). Asimismo, se ha observado que el consumo, preferencia o tolerancia por determinados aminoácidos en los embriones de hámster (Seshagiri y Bavister, 1991a) y bovinos (Partridge y Leese, 1996) varían según la fase de desarrollo.

Rosenkrans *et al.* (1989) estudiaron el efecto sobre el desarrollo de embriones porcinos de cuatro aminoácidos, glutamina, metionina, fenilalanina e isoleucina, ya que habían mejorado el desarrollo embrionario en hámster (Bavister *et al.*, 1983). En este estudio, el efecto de los aminoácidos dependió de la presencia o no de suero en el medio; siendo la glutamina beneficiosa en ausencia de suero y perjudicial en su presencia, mientras que en el caso de la fenilalanina, metionina e isoleucina ocurrió lo contrario (Rosenkrans *et al.*, 1989). Es posible que el efecto promotor del crecimiento del suero, unido a la presencia de aminoácidos en el propio suero, modificase las necesidades específicas de aminoácidos del embrión. Por el contrario, en otro trabajo realizado sobre embriones porcinos de 1 ó 2 células *obtenidos in vivo*, la adición de todos los aminoácidos, tanto esenciales como no esenciales, en el medio BECM-3 completamente definido o enriquecido con BSA no fue perjudicial para el desarrollo *in vitro* de los embriones (Dobrinsky *et al.*, 1996).

Gardner *et al.* (1994) demostraron que los embriones ovinos eran sensibles a la producción de amonio, generado por la degradación espontánea de los aminoácidos durante el cultivo (especialmente de la glutamina) y por el propio metabolismo de los aminoácidos. Estos autores aconsejaron la renovación del medio de cultivo cada 48 horas con el fin de eliminar el amonio (Gardner *et al.*, 1994); que podría inhibir la división y desarrollo embrionario, incrementar la fragmentación citoplasmática de los embriones (Walker *et al.*, 1992) y estar implicado en la inducción del síndrome del sobrepeso al nacimiento en embriones cultivados *in vitro* (McEnvoy *et al.*, 1999).

El amonio presente en el medio de cultivo puede afectar al desarrollo embrionario de distintas maneras: disminuyendo la producción de ATP (Gardner y Lane, 1993) y elevando el pH intracelular, ya que es una base débil. Sin embargo McKiernan y Bavister (1994) no encontraron beneficios al renovar el medio de cultivo a determinados intervalos de tiempo. Como vimos en el apartado 2.2.3.1.2., los embriones producen factores que estimulan su desarrollo y que eliminamos al renovar el medio de cultivo cada cierto tiempo (Gardner y Lane, 1993); por lo que el refresco del medio de cultivo cada cierto tiempo presenta ventajas e inconvenientes.

2.2.3.3.4. Taurina e hipotaurina

La taurina está presente a altas concentraciones tanto en las secreciones del oviducto y útero, como en los ovocitos y embriones mamíferos (Miller y Schultz, 1987; Kaye, 1986; Gardner, 1999). Los niveles de taurina en los fluidos del tracto reproductivo femenino experimentan un pico en los primeros días del ciclo, decreciendo con el tiempo.

El medio NCSU23 fue formulado a partir de un medio de cultivo existente (Petters *et al.*, 1990), gracias a un estudio sobre el efecto de la taurina e hipotaurina sobre el desarrollo *in vitro* de embriones porcinos de 1-2 células obtenidos *in vivo* (Petters y Reed, 1991). En él se demostró que la adición de taurina y/o hipotaurina mejoraba significativamente el desarrollo de embriones cultivados *in vitro*. Además se observó que un mayor porcentaje de mórulas evolucionaba hasta blastocisto gracias a la adición tanto de taurina como hipotaurina. Se sabe que la taurina es un potente osmoprotector, aunque no se conoce el mecanismo por el que se mejora el desarrollo embrionario en su presencia.

2.2.3.3.5. Ácido hialurónico

En vacuno, los glicosaminoglicanos (GAGs) como el ácido hialurónico, condroitin sulfato, dermatan sulfato y heparina son abundantes en el fluido uterino (Lee y Ax, 1984), por lo que podrían estar involucrados en el desarrollo embrionario *in vivo*. Se ha demostrado que los GAGs promueven la viabilidad de los ovocitos porcinos (Sato *et al.*, 1990).

Se ha logrado una mejora en el desarrollo a blastocisto tanto en embriones PIV (17% vs 0%; Kano *et al.*, 1998) como en embriones de 1-2 células obtenidos *in vivo* (70% vs 45%; Miyano *et al.*, 1994), al cultivarlos en medio Whitten enriquecido con 0,4% de BSA y 0,5 mg/mL de ácido hialurónico, comparado con la no adición de ácido hialurónico. Sin embargo, al incrementar la concentración de BSA de 0,4% a 1,5%, la adición de ácido hialurónico no produjo este efecto beneficioso (Miyano *et al.*, 1994); lo que sugiere que algún factor presente en la BSA, cuando ésta se añade a concentraciones altas, puede tener un efecto negativo sobre la acción estimuladora del ácido hialurónico.

No se conoce el mecanismo exacto por el que el ácido hialurónico mejora el desarrollo embrionario, aunque se ha sugerido un efecto promotor en la viabilidad embrionaria (Sato *et al.*, 1990).

2.2.3.4. Medios de cultivo secuenciales y sistema de cultivo en perfusión

La fisiología del embrión mamífero cambia a lo largo del periodo preimplantacional, por lo tanto, sus requerimientos nutricionales también cambian en los sucesivos estadios de desarrollo (Gardner, 1999). En paralelo con los cambios en las necesidades nutricionales, el ambiente al que se expone el embrión en el tracto reproductor de la hembra va variando según el embrión progresa a través del oviducto y el útero (Gardner, 1999).

Por lo tanto, las condiciones de cultivo óptimas para el desarrollo de los cigotos no van a ser las mismas que para el desarrollo y diferenciación del blastocisto (Gardner, 1999). El uso de medios de cultivo secuenciales, que imitan mejor las condiciones *in vivo* que el empleo de un medio de cultivo único a lo largo de todo el desarrollo preimplantacional, ha mejorado el desarrollo y la viabilidad embrionario en embriones de ratón (Lane y Gardner, 1997), mujer (Gardner *et al.*, 1998) y vaca (Steeves y Gardner, 1997).

Recientemente, se ha establecido un sistema nuevo de cultivo, el cultivo en perfusión (Thompson, 1996), que permite exponer al embrión a un gradiente nutritivo y a la vez posibilita la eliminación de sustancias tóxicas como el amonio, generadas en los sistemas estáticos. Este sistema de cultivo constituye una nueva aproximación a las condiciones a las que se expone el embrión *in vivo* y, según Gardner (1999), provoca un menor estrés en el embrión, lo que se traduce en una mayor viabilidad. Actualmente se está trabajando en el desarrollo del equipo necesario para realizar el cultivo en perfusión (McGowan y Thompson, 1997)

2.2.3.5. Morfología y calidad de los embriones producidos *in vitro*

A pesar de los notables avances en la PIV de embriones porcinos, la morfología de los embriones PIV, incluidos los blastocistos, difiere de la de los embriones obtenidos *in vivo* (Wang *et al.*, 1999a). Asimismo, el número de células que constituyen los blastocistos PIV es menor que la de los obtenidos *in vivo* (Papaioannou y Ebert, 1988).

Wang *et al.* (1999a) evaluaron la morfología y los filamentos de actina de embriones producidos *in vitro* e *in vivo*, y comprobaron que *in vivo* los blastocistos presentaban una masa celular interna más prominente y que los blastómeros de los embriones tempranos tenían un aspecto más definido que los de los producidos *in vitro*. Asimismo, sugirieron que las divisiones anómalas y el bajo número de células en los blastocistos, que aparecen en los embriones PIV, se podía deber a las alteraciones observadas en la distribución de los filamentos de actina en el citoplasma, ya que éstos están involucrados en el proceso de división celular.

2.2.3.6. Valoración de la capacidad de desarrollo embrionario

El parámetro por el que se valora la capacidad de desarrollo de los embriones MIV-FIV-CE en la mayoría de laboratorios es el desarrollo hasta el estadio de blastocisto. Por otra parte, un mayor número de células en el blastocisto se considera un signo de calidad embrionaria, ya que, como hemos visto, el número de células de los blastocistos obtenidos *in vivo* suele superar al de los embriones PIV. También se ha empleado el parámetro del porcentaje de blastocistos eclosionados en cultivo como indicador de la calidad embrionaria, aunque este hecho no está comprobado.

Sin embargo, hemos visto que el sistema de producción *in vitro* ocasiona alteraciones en el embrión, que pueden llegar a ser compatibles con el desarrollo a blastocisto (Duranton y Renard, 2002). Por lo tanto, la prueba definitiva que va a medir la viabilidad embrionaria es el establecimiento de gestaciones y el nacimiento de crías vivas tras la transferencia de los embriones a una hembra receptora. Actualmente, el éxito alcanzado en las transferencias de embriones PIV según diferentes autores ha sido muy variable, y como mucho sólo el 20% ó 30% de los embriones sobrevive tras la

transferencia (Abeydeera, 2002). Desgraciadamente, la transferencia de embriones tiene un costo elevado, tanto en tiempo como económico, que no hacen posible su ejecución de manera rutinaria.

La división embrionaria a las 48 h es un parámetro bastante subjetivo, debido a la dificultad de distinguir entre un embrión dividido correctamente y otro fragmentado o dividido partenogénicamente, sólo mediante criterios morfológicos. En un estudio en el que se analizaron las alteraciones en la división se observó que, de los embriones producidos *in vitro*, sólo el 73% de los embriones de 2 células, el 26% de 3 células, el 49% de 4 células y el 26% de 5 a 8 células eran morfológicamente normales (con un núcleo por blastómera), presentando el resto una división citoplasmática y nuclear asincrónica, que dio lugar a embriones fragmentados o con blastómeras binucleadas; mientras que en los embriones obtenidos *in vivo* no se observó ninguna alteración en la división (Wang *et al.*, 1999a).

2.2.3.7. Ovocitos poliespérmicos

Han *et al.* (1999a) demostraron que los ovocitos polipronucleares producidos *in vitro* eran capaces de dividirse y desarrollarse hasta blastocisto, *in vitro* e *in vivo*, en porcentajes similares a los de los ovocitos con 2 pronúcleos. No obstante, la masa celular interna de los blastocistos procedentes de ovocitos polipronucleares contenía un menor número de células que los procedentes de ovocitos con 2 pronúcleos. Sorprendentemente, al transferir ovocitos polipronucleares a hembras receptoras se logró el nacimiento de lechones, que mostraron una ploidía normal (Han *et al.*, 1999b). Parece ser que la localización del pronúcleo dentro citoplasma de los ovocitos polipronucleares va a influir en la ploidía del embrión resultante (Han *et al.*, 1999b).

En un reciente estudio llevado a cabo por Xia *et al.* (2001), se ha sugerido que en condiciones *in vivo*, la actividad lisosómica del citoplasma de los ovocitos fecundados y de los embriones podría actuar eliminando los espermatozoides accesorios de manera fisiológica. Por lo que, aunque las fecundaciones poliespérmicas se consideran patológicas y suelen acabar en la muerte del cigoto (Hunter, 1991), en el caso del porcino la poliespermia podría ser un fenómeno fisiológico, ya que parece que estos embriones tienen

mecanismos para eliminar los espermatozoides sobrantes y continuar el desarrollo a término.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

El desarrollo de las pruebas se ha realizado en el laboratorio del Departamento de Reproducción Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA).

En este apartado se describen los materiales y las metodologías empleados en el presente trabajo.

3.1. ANIMALES UTILIZADOS

Los ovarios utilizados procedían de cerdas híbridas comerciales prepúberes de un peso entre 90 y 110 kg, procedentes de un matadero cercano (GYPISA, Pozuelo de Alarcón).

El semen utilizado provenía de un verraco híbrido (Large White x Landrace) alojado en la granja experimental del Departamento de Reproducción Animal del INIA.

3.2. MEDIOS DE CULTIVO

Salvo que se indique lo contrario, todos los reactivos empleados fueron obtenidos de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

Si no se especifica lo contrario, la preparación de los medios de cultivo se realizó en las siguientes condiciones: Los medios se prepararon el mismo día de su utilización con agua ultrapura (Milli-Q), añadiendo los compuestos y los suplementos específicos para cada caso particular, descritos a continuación. Se midió la osmolaridad, que debía estar en torno a 280 mOsm, aproximadamente. A continuación se esterilizaron por filtración, haciéndolos pasar a través de un filtro de membrana con un diámetro de poro de 0,22 μm en cabina de flujo laminar (Telstar), y se conservaron a 4°C en condiciones estériles en frasco de cristal sellado. El pH se ajustó a 7,4 en el incubador (Heraeus) a 39°C, 5% de CO₂ y atmósfera saturada de humedad durante al menos tres horas antes de ser utilizados.

3.2.1. Solución salina

Utilizada para el transporte y lavado de los ovarios.

Composición: 0,9% (p/v) de NaCl con 100 mg/L de sulfato de kanamicina.

Osmolaridad de 320 mOsm.

3.2.2. Tampón fosfato salino modificado (PBSm)

Utilizado para el lavado de los ovarios, y para la recuperación y selección de los COCs.

Tabla 1. Composición del PBSm

Componente	Concentración (mM)
NaCl	136,89
KCl	2,68
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,68
MgCl ₂ ·7H ₂ O	0,49
KH ₂ PO ₄	1,47
Na ₂ HPO ₄	8,06
Glucosa	10,09
BSA	1 mg/mL
Penicilina G sódica	50 UI/mL
Sulfato de estreptomina	30 mg/mL

El medio PBSm se preparó el día previo a su utilización. Tras su preparación, se midió el pH en un pHmetro (Crison) y se ajustó a 7,2. El pH de trabajo del PBSm debe ser de 7,4, pero se ajusta a 7,2 debido a que tras la filtración el pH sube aproximadamente en 0,2 puntos. El medio se conservó a 4°C en condiciones estériles en frasco de cristal sellado. En el momento de su utilización, los frascos de cristal se introdujeron en un baño con termostato a 38°C, con el fin de atemperar el medio.

3.2.3. Medios de maduración *in vitro* (MIV)

La base de los diferentes medios que se emplearon para la MIV ha sido el medio NCSU23 (Tabla 2) libre de BSA (Petters y Wells, 1993) enriquecido con 10% (v/v) de fluido folicular porcino (PFF), 0,1 mg/mL de cisteína y 0,05 mg/mL de gentamicina.

Tabla 2. Composición del medio NCSU23 libre de BSA (Petters y Wells, 1993) con 10% de PFF, 0,1 mg/mL de cisteína y 0,05 mg/mL de gentamicina

Componente	Concentración (mM)
NaCl	108,73
KCl	4,78
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,70
KH ₂ PO ₄	1,19
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,19
NaHCO ₃	25,07
Glucosa	5,55
Glutamina	1
Taurina	7
Hipotaurina	5
Cisteína	0,57 (0,1 mg/mL)
PFF	10% (v/v)
Gentamicina	0,05 mg/mL
Rojo Fenol	0,003

El fluido folicular porcino (PFF) se obtuvo por aspiración, con jeringa de 10 mL y aguja de 18 G, de folículos de 3-6 mm de diámetro. Posteriormente se centrifugó a 1900 g durante 30 minutos a una temperatura de 5°C, se pasó por un filtro de membrana con un diámetro de poro de un 1,0 µm (Puradisc-25AS. Whatman) y se conservó a -20°C hasta su uso.

El medio descrito en la tabla 2 se consideró el medio MIV-control. En el caso del medio MIV-EGF (Abeydeera *et al*, 1998c), el medio control se complementó con 10 ng/mL de EGF (factor de crecimiento epidérmico); y en el del medio MIV-FPF (Abeydeera *et al*, 1998b), se añadieron 6 fragmentos de pared folicular (FPF), con un tamaño aproximado de 600 a 900 μm , en cada pocillo de cultivo con medio control. Los FPF se obtuvieron de folículos ováricos de 3 a 6 mm, se lavaron tres veces en PBSm y tres veces más en medio de MIV antes de ser colocados en los pocillos de cultivo. Además, en los tres casos, este medio base se enriqueció con hormonas: eCG y hCG (Foligon, Chorulon; Intervet International BV, Boxmeer, Holanda) durante las primeras 22 horas de maduración. En la tabla 3 se resumen los diferentes suplementos para cada medio de maduración.

Tabla 3. Suplementos del medio NCSU23 libre de BSA con 10% de PFF, 0,1 mg/mL de cisteína y 0,05 mg/mL de gentamicina (MIV-control), según su utilización

Suplementos	MIVcontrol + hormona	MIVcontrol	MIV-EGF + hormona	MIV-EGF	MIV-FPF + hormona	MIV-FPF
ECG	10 UI/mL	-	10 UI/mL	-	10 UI/mL	-
HCG	10 UI/mL	-	10 UI/mL	-	10 UI/mL	-
EGF	-	-	10 ng/mL	10 ng/mL	-	-
FPF	-	-	-	-	6 fragmentos/ pocillo	6 fragmentos/ pocillo

3.2.4. Medios de fecundación *in vitro* (FIV)

Se utilizaron dos medios de FIV diferentes: el TBMm (Abeydeera y Day, 1997b) enriquecido con 1 mg/mL de BSA, 1 mM de cafeína y 0,05 mg/mL de gentamicina (tabla 4), y el TALPm (Rath, 1996; Rath *et al*, 1999) (tabla 5).

En el caso del TBMm, como tras su preparación el pH es de 9,8-10, este medio se mantuvo durante 18-24 horas en el incubador, en condiciones de 39°C de temperatura y 5% de CO₂ en atmósfera saturada de humedad, para estabilizar su pH a 7,2-7,3 (Abeydeera *et*

al, 1998b). Los medios de fecundación se prepararon la tarde previa a su utilización, para dar tiempo a equilibrar el pH en el caso del TBMm.

Tabla 4. Composición del medio TBMm (Abeydeera y Day, 1997b) enriquecido con 1 mg/mL de BSA, 1 mM de cafeína y 0,05 mg/mL de gentamicina

Componente	Concentración (mM)
NaCl	113,1
KCl	3
CaCl ₂ ·2H ₂ O	7,5
Tris	20
Glucosa	11
Piruvato sódico	5
Cafeína	1
BSA	1mg/mL
Gentamicina	0,05mg/mL
Rojo fenol	0,003

Tabla 5. Composición del TALPm (Rath, 1996; Rath *et al*, 1999)

Componente	Concentración (mM)
NaCl	114,06
KCl	3,2
NaHCO ₃	25,07
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,5
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,35
Lactato sódico	10
Lactato cálcico·5H ₂ O	8
Glucosa	5
Cafeína	2
Sulfato de kanamicina	0,17
PVA	1 mg/mL
BSA	3 mg/mL
Piruvato sódico	0,12 mg/mL
Rojo fenol	0,003

3.2.5. Medios de cultivo de embriones (CE)

Los medios utilizados para el cultivo de los embriones fueron el NCSU23 (Petters y Wells, 1993) y el mismo medio enriquecido con aminoácidos esenciales (BME: *basal medium Eagle amino acids*) y no esenciales (MEM: *minimum essential medium Eagle non-essential amino acids*), que designaremos NCSU23aa (Long *et al*, 1999). En ambos casos, estos medios se enriquecieron con 4 mg/mL de BSA en las primeras 125 horas de cultivo (5 días y 5 horas), y con 10% de FCS a partir de ese momento y hasta finalizar el cultivo (192 horas) (Long *et al*, 1999) (tablas 6 y 7).

Tabla 6. Composición del medio NCSU23 libre de BSA (Petters y Wells, 1993)

Componente	Concentración (mM)
NaCl	108,73
KCl	4,78
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,70
KH ₂ PO ₄	1,19
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,19
NaHCO ₃	25,07
Glucosa	5,55
Glutamina	1
Taurina	7
Hipotaurina	5
Gentamicina	0,05 mg/mL
Rojo Fenol	0,003

Tabla 7. Suplementos del medio NCSU23 según su utilización

Suplementos	NCSU23-BSA	NCSU23-FCS	NCSU23aa-BSA	NCSU23aa-FCS
BSA	4 mg/mL		4 mg/mL	
FCS		10% (v/v)		10% (v/v)
MEM			10 mL/L	10 mL/L
BME			20 mL/L	20 mL/L

3.2.6. Medio de conservación de los espermatozoides

El día de la recogida del semen, el medio de conservación de semen (Acromax®) se atemperó a 37°C en el baño maría.

3.3. RECOGIDA Y TRANSPORTE DE OVARIOS

Los ovarios se obtuvieron del matadero GYPISA (Pozuelo de Alarcón), situado a 10 km de nuestro laboratorio, a partir de cerdas prepúberes híbridas comerciales de un peso entre 90 y 110 kg, y se transportaron al laboratorio en un termo con solución salina previamente atemperado a 38°C, en un plazo máximo de una hora desde el sacrificio de los animales.

Una vez en el laboratorio, se retiraron los restos de oviducto y los ovarios se lavaron dos veces con solución salina. Se seleccionaron los ovarios con mejor desarrollo folicular y se desecharon aquéllos que presentaban cuerpos lúteos, formaciones quísticas o una morfología anormal. Los ovarios seleccionados se mantuvieron dentro de un vaso de precipitado con solución salina en el baño maría a 38°C hasta el momento de su procesamiento.

3.4. OBTENCIÓN Y SELECCIÓN DE OVOCITOS

Los ovarios se manipularon con pinzas de mano en una placa de Petri de cristal estéril sobre placa calefactora a 38°C. La punción de los folículos ováricos de tamaño adecuado (de 3 a 6 mm de diámetro) se realizó con la punta de un bisturí y posteriormente se lavó el ovario con PBSm (tabla1). El contenido de la placa de Petri, constituido por fluido folicular, complejos cúmulus-ovocito (COCs) y PBSm, se vertió en tubos Falcon de 15 mL y se dejó en el baño maría a 38°C a la espera de finalizar el procesado de todos los ovarios, aproximadamente 40-50 en cada sesión.

Una vez decantado el contenido de los tubos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en PBSm atemperado a 38°C. Bajo el estereomicroscopio (Nikon), a 20 aumentos y sobre placa calefactora a 39°C, se seleccionaron los COCs de aspecto compacto, con ovocitos de citoplasma homogéneo, finamente granulado y rodeados por 3 ó más capas de células del cúmulus. Tanto los COCs, como posteriormente los ovocitos desnudos y los embriones se manipularon con una pipeta Pasteur estirada por calor, para reducir su grosor, y con el extremo romo. La pipeta se conectó a un tubo

flexible de silicona, a su vez conectado con una pieza adaptada para hacer succión con la boca, y se intercalaron a lo largo del tubo dos filtros para impedir la contaminación. La pipeta fue sustituida por una nueva cada vez que se cambió de medio.

3.5. MADURACIÓN *IN VITRO* (MIV)

Los COCs seleccionados se lavaron dos veces en PBSm atemperado a 39°C y tres veces en medio de MIV con suplemento hormonal (tablas 2 y 3), previamente equilibrado en el incubador. Todos los lavados se hicieron en placas de Petri (35 mm de diámetro; Nunclon). El cultivo se llevó a cabo en placas Nunc de 4 pocillos, en grupos de 50 COCs por pocillo, en un volumen de 500 µL de medio de MIV cubierto por 200 µL de aceite mineral. Los COCs fueron así cultivados durante 22 horas en el incubador, en condiciones de 39°C de temperatura y 5% de CO₂ en atmósfera saturada de humedad.

Tras este tiempo, se valoró el grado de expansión del cúmulus y se eliminaron los COCs que no habían expandido. Los COCs seleccionados se lavaron tres veces en medio de MIV sin hormona (tablas 2 y 3), previamente equilibrado en el incubador, y se cultivaron igualmente en placas Nunc en el incubador durante 22 horas.

En la experiencia 1 se probaron 3 medios de MIV: el medio MIV-control, el medio MIV-EGF (complementado con 10 ng/mL de EGF) y el medio MIV-FPF (complementado con 6 FPF por pocillo) (tablas 2 y 3). Mientras que en el resto de experiencias, los ovocitos fueron madurados en medio MIV-EGF. Todos los medios de MIV fueron medios modificados respecto al NCSU23 libre de BSA (Petters y Wells, 1993).

3.6. RECOGIDA Y PROCESADO DEL SEMEN

El semen utilizado procedía de un único verraco híbrido (Large White x Landrace) perteneciente al INIA y alojado en la granja experimental del Departamento de Reproducción Animal del INIA.

El ritmo de recogida fue de un salto por semana. La extracción del semen se realizó mediante el método manual, recogiendo únicamente la fracción rica del eyaculado en un termo atemperado a 37°C.

Inmediatamente después de la recogida el semen se transportó al laboratorio, donde fue procesado. Se realizó la contrastación del semen puro, en la que se valoró el volumen del eyaculado, el porcentaje de células en movimiento, la calidad del movimiento, el grado de aglutinación, la concentración espermática, el grado de morfoanomalías y el estado del acrosoma. Se consideró válido para su utilización en la fecundación *in vitro* aquel eyaculado con un porcentaje de espermatozoides en movimiento superior al 80%, con más del 80% de acrosomas normales y menos del 10% de formas anormales.

Para calcular la concentración espermática se utilizó una cámara de Bürker. El semen puro fue previamente diluido en una proporción 1:100 (v/v) en una solución salina (0.9% p/v) con formaldehído a una concentración de 0.3% (solución salina formolada). Utilizando el microscopio de contraste de fases (Nikon) a 400 aumentos se hizo el recuento del número de espermatozoides, que se expresó como el número de espermatozoides por mililitro (spz/mL).

El porcentaje de células en movimiento, la calidad del movimiento y el grado de aglutinación se evaluó mediante la observación en el microscopio de contraste de fases a 100 aumentos de una muestra de semen depositado sobre un portaobjetos precalentado en una placa calefactora a 37°C. Se valoró el porcentaje de espermatozoides con movimiento (en una escala de 1 a 100), la calidad de movimiento según fuera más o menos rectilíneo, progresivo y rápido (en una escala de 0 a 5) (Du Mesnil Du Buisson y Signoret, 1971), y el grado de aglutinación (en una escala de 0 a 3).

Para valorar el grado de morfoanomalías, así como el estado del acrosoma, 100 µL de semen puro se diluyeron en 1 mL de una solución al 2% de glutaraldehído en solución isosmótica. El grado de morfoanomalías se analizó evaluando al menos 100 células espermáticas en microscopio de contraste de fases a 1000 aumentos con objetivo de inmersión. Las morfoanomalías se clasificaron en: presencia de gota citoplasmática

proximal, presencia de gota citoplasmática distal, cola en látigo, cola en ovillo, etc., y los resultados se expresaron como porcentaje de formas anormales.

Asimismo, el porcentaje de acrosomas normales se determinó, según los criterios de Pursel (Pursel *et al.*, 1972), en una muestra de 10 μ L de la dilución de espermatozoides fijados, observándose al menos 50 espermatozoides en microscopio de contraste de fases a 1000 aumentos con objetivo de inmersión. Se clasificaron como acrosomas normales si los espermatozoides presentaban bordes apicales bien definidos y nítidos en forma de semiluna oscura.

El semen se diluyó en medio de conservación Acromax® en una proporción 1:10 (v/v) y se dejó durante dos horas a temperatura ambiente y en oscuridad, en tubos de polipropileno de 10 mL. Posteriormente, los tubos se metieron en una cámara de refrigeración a 15°C, para conservar el semen durante 24 horas hasta su utilización.

3.7. FECUNDACIÓN *IN VITRO* (FIV)

3.7.1. Preparación de los ovocitos

Tras finalizar el segundo periodo de maduración, se eliminaron las células del cúmulus de forma mecánica, por sucesivos pases a través de una pipeta automática de los COCs en medio de MIV (tabla 2) complementado con 1 mg/mL de hialuronidasa, equilibrado previamente en el incubador. El contacto con la hialuronidasa fue siempre inferior a 3 minutos.

Los ovocitos, ya libres de células del cúmulus, se lavaron tres veces en el medio de FIV, previamente equilibrado en el incubador, y se eliminaron los ovocitos que hubieran degenerado. El medio de FIV empleado en todas las experiencias fue el TBMm (Abeydeera y Day, 1997b) (tabla 4), y además en la experiencia 2 se utilizó TALPm (Rath *et al.*, 1999). Los ovocitos fueron depositados, en grupos de 20-22, en microgotas de 50 μ L de medio de FIV cubiertas por 900 μ L de aceite mineral, en placas Nunc de 4 pocillos, dejándose en el incubador mientras se procedía a la preparación de los espermatozoides.

Las microgotas se prepararon de la siguiente forma: primero se colocó en el centro de cada pocillo una microgota de 5 μL de medio que se cubrió con 900 μL de aceite mineral, y a continuación se añadieron 45 μL más de medio a la microgota, y se equilibraron en el incubador.

3.7.2. Preparación de los espermatozoides

El semen diluido en medio de conservación se mantuvo durante 24 h en refrigeración a 15°C. Una muestra del semen se colocó en un portaobjetos atemperado a 37°C, para valorar porcentaje de espermatozoides móviles y la calidad del movimiento. Una muestra de semen se fijó en una solución al 2% de glutaraldehído en solución isosmótica, para evaluar el porcentaje de acrosomas normales. A continuación, el semen se centrifugó en una centrífuga (Heraeus) a 200g durante 3 minutos, y el sobrenadante se sometió a una segunda centrifugación a 1000g durante 3 minutos para eliminar el plasma seminal y el medio de conservación. El sedimento de esta segunda centrifugación se resuspendió en 1 mL de medio de FIV, equilibrado previamente en el incubador.

La dilución de espermatozoides en el medio de FIV se dejó en el incubador de 5 a 10 minutos, mientras se procedía al cálculo de la concentración, para evitar cambios de pH. La concentración espermática se ajustó, utilizando para diluir el mismo medio de FIV, al doble de la final deseada en la microgota de fecundación. Así, al añadir 50 μL de esta dilución de espermatozoides en las microgotas de fecundación de 50 μL , la concentración final de espermatozoides fue la correcta.

Tras ajustar la concentración espermática, se volvió a valorar el porcentaje de espermatozoides móviles y la calidad de movimiento. Asimismo, el porcentaje de espermatozoides funcionales o alterados se estimó en una muestra de la dilución de espermatozoides preparada para la FIV, mediante tinción con diacetato de carboxifluoresceína (DCF) / yoduro de propidio (IP). El DCF es capaz de entrar en células con una buena integridad funcional de la membrana plasmática, mientras que el IP sólo penetra en células que tengan la membrana dañada o alterada. En un eppendorf opaco se mezcló 1 mL de la dilución de espermatozoides con 20 μL de una solución de diacetato de

carboxifluoresceína en dimetil sulfóxido (0,46 mg DCF/mL), con 20 μ L de una solución de yoduro de propidio en solución salina (500 μ g IP/mL) y con 10 μ L de solución salina formolada, y se incubó durante 10 minutos a 37°C (Harrison y Vickers, 1990).

La evaluación de los espermatozoides funcionales o alterados se realizó mediante observación en un microscopio de contraste de fases de fluorescencia, equipado con un condensador de epifluorescencia (Nikon), una lámpara de mercurio de alta presión HBO de 100W y el filtro de excitación azul, con una longitud de onda de 450-490 nm. Una muestra de 10 μ L del contenido del eppendorf se observó en este microscopio a 400 aumentos; y se contabilizaron al menos 200 espermatozoides, que se clasificaron como vivos si emitían fluorescencia verde, debido al DCF, o muertos si emitían fluorescencia roja, debido al IP.

3.7.3. Cocultivo de ovocitos y espermatozoides

En las microgotas donde se habían depositado los ovocitos, se añadieron 50 μ L de la dilución de espermatozoides en medio de FIV. De este modo, la concentración final de espermatozoides en las microgotas de fecundación de 100 μ L de volumen final fue de 0,5x10⁶ spz/mL en las experiencias 1 y 2, y de 1x10⁶ spz/mL en las experiencias 2, 3 y 4.

En las experiencias 1 y 2 se utilizó el método de cocultivo estándar de nuestro laboratorio, es decir, la incubación durante 4 horas de los ovocitos con el total de la concentración espermática, en condiciones de 39°C de temperatura y 5% de CO₂ en atmósfera saturada de humedad (Coy *et al.*, 1993). En la experiencia 3 se emplearon dos métodos de cocultivo: el estándar y el método en dos pasos (Gruppen y Nottle, 2000), que consistió en una primera incubación de 10 minutos de los ovocitos con el total de la concentración espermática (1x10⁶ spz/mL), seguida del paso de los ovocitos con los espermatozoides adheridos a su ZP a una microgota de 100 μ L de medio de FIV fresco, equilibrada en el incubador previamente, en la que fueron incubados durante 4 horas más. En la experiencia 4 se aplicó el método de cocultivo en dos pasos.

3.8. CULTIVO DE EMBRIONES (CE)

A las 4 horas del cocultivo, los posibles cigotos se lavaron 3 veces, para eliminar los restos de espermatozoides, en el medio de cultivo de embriones (NCSU23-BSA en las experiencias 1, 2, 3 y 4, y NCSU23aa-BSA en la experiencia 4; tablas 6 y 7), previamente equilibrado en el incubador. Tras los lavados, los cigotos se colocaron en grupos de 45-50 por pocillo, en placas Nunc de 4 pocillos, con 500 μL de NCSU23-BSA cubierto con 200 μL de aceite mineral (experiencias 1, 2 y 3). En la experiencia 4, los embriones se cultivaron tanto en NCSU23-BSA como en NCSU23aa-BSA; y en ambos casos en 500 μL de medio cubierto con 200 μL de aceite mineral, o en microgotas de 50 μL cubiertas con 750 μL de aceite mineral, igualmente en grupos de 45-50 embriones por pocillo, en placas Nunc de 4 pocillos. De este modo se cultivaron durante 125 horas en el incubador en condiciones de 39°C de temperatura y 5% de CO_2 en atmósfera saturada de humedad.

Tras las 125 horas de cultivo, los embriones se lavaron 3 veces en el mismo medio en el que habían sido cultivados pero sustituyendo la complementación con BSA por 10% FCS, es decir, en NCSU23-FCS o NCSU23aa-FCS (tabla 6 y 7), eliminando aquéllos no divididos, fragmentados o degenerados. Los embriones morfológicamente aceptables se pasaron a placas Nunc de 4 pocillos con medio de cultivo NCSU23-FCS o NCSU23aa-FCS, en el mismo volumen en el que hubieran sido cultivados previamente (500 μL ó 50 μL), en grupos de 45-50 embriones por pocillo, y se dejaron en el incubador en condiciones de 39°C de temperatura y 5% de CO_2 en atmósfera saturada de humedad hasta el final del cultivo.

El desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto sólo se llevó a cabo en las experiencias 1 y 4, mientras que en las experiencias 2 y 3 el cultivo de los posibles cigotos se mantuvo hasta las 18 horas, momento en el que fueron fijados y teñidos con Hoechst, para valorar la penetración. En la experiencia 1 se fijó la mitad de los posibles cigotos a las 18 horas, mientras que la otra mitad se dejó en cultivo.

3.8.1. Valoración microscópica de resultados

La división y el desarrollo embrionario se valoraron mediante observación en estereomicroscopio a 50 aumentos y en microscopio invertido (Nikon) con óptica Hoffman. Se consideraron embriones divididos, los que a las 48 horas de cultivo se encontraban en estadio de 2-4 células con blastómeros homogéneos; mórulas, los embriones desde 8 células hasta la compactación; y blastocistos, los que formaron blastocele, incluyendo en este grupo a los blastocitos no expandidos, expandidos y eclosionados.

Los parámetros de desarrollo embrionario evaluados fueron los siguientes:

- Porcentaje de división embrionaria (**% División**), se calculó como el número de embriones divididos a las 48 horas con respecto al total de los posibles cigotos puestos en cultivo.
- Porcentaje de mórulas sobre el total (**% Mórulas/n**), se contabilizó como el número de mórulas con respecto al total de los posibles cigotos puestos en cultivo.
- Porcentaje de mórulas sobre los divididos (**% Mórulas/Divididos**), se valoró como el número de mórulas con respecto al total de embriones divididos a las 48 horas.
- Porcentaje de blastocistos sobre el total (**% Blastocistos/n**), se contabilizó como el número de blastocistos con respecto al total de los posibles cigotos puestos en cultivo.
- Porcentaje de blastocistos sobre los divididos (**% Blastocistos/Divididos**), se valoró como el número de blastocistos con respecto al total de embriones divididos a las 48 horas.
- Porcentaje de blastocistos sobre los divididos (**% Blastocistos/Mórulas**), se valoró como el número de blastocistos con respecto al total de mórulas.

3.9. FIJACIÓN DE ZIGOTOS Y TINCIÓN CON HOECHST

A las 18 horas tras la FIV, los posibles cigotos se fijaron en una solución de paraformaldehído en PBSm (4 mg/mL) con 10% de Triton X-100 durante 1 hora a

temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron dos veces en PBSm y se mantuvieron 1 hora en agitación suave. Tras ello, los cigotos se sometieron a dos lavados más en PBSm.

Una vez fijados, los cigotos se tiñeron con Hoechst 33342. Este compuesto es un fluorocromo que interacciona con el ADN y, por lo tanto, permite observar la morfología nuclear. En un portaobjetos desengrasado se puso una gota de 10-15 μL de una solución de Hoechst en glicerol (1 μg de Hoechst/mL). Los cigotos fueron transferidos en un volumen mínimo de PBSm a la gota con Hoechst, que fue cubierta con un cubreobjetos, sellándose los bordes con esmalte. Los portaobjetos ya montados se guardaron en una caja oscura a 4°C hasta su examen microscópico, que se realizó entre las 24 y 48 h posteriores.

3.9.1. Valoración microscópica de los resultados

Las observaciones de la cromatina se realizaron en el microscopio de fluorescencia a 400 aumentos y bajo filtro de excitación ultravioleta, con una longitud de onda de 330-380 nm. Según fuera la morfología de la cromatina teñida con el Hoechst, los ovocitos o cigotos se clasificaron en:

- a) ovocitos no maduros a nivel nuclear: aquéllos en estadios anteriores a metafase II, como vesícula germinal o metafase I,
- b) ovocitos maduros a nivel nuclear: aquéllos en estadio de MII (placa metafásica y primer corpúsculo polar), o con un pronúcleo femenino, y
- c) ovocitos penetrados: aquéllos con al menos un espermatozoide en su interior, ya fuera con cabeza en forma compacta, descondensada o de pronúcleo masculino, además del pronúcleo femenino.

A su vez, en los ovocitos penetrados se valoró:

- c.1) penetración monospémica: aquellos ovocitos con un solo espermatozoide en su interior, en cualquiera de sus formas,
- c.2) formación de pronúcleo masculino (PNM): aquéllos con al menos un pronúcleo masculino, además del femenino, y

c.3) número de espermatozoides por ovocito penetrado: número total de espermatozoides en cada ovocito, en cualquiera de sus formas.

En ocasiones se observaron ovocitos o cigotos degenerados o no evaluables por la técnica de tinción, que también quedaron registrados, aunque fueron descartados en el estudio estadístico.

Los parámetros estudiados gracias a los datos obtenidos con la tinción de Hoechst fueron los siguientes:

- Porcentaje de ovocitos maduros a nivel nuclear (**% maduración nuclear**). Se calculó como el número de ovocitos maduros nuclearmente sobre el total de ovocitos fijados.
- Porcentaje de ovocitos penetrados (**% penetración**). Se valoró como el número de ovocitos penetrados sobre el total de ovocitos maduros a nivel nuclear.
- Porcentaje de monospermia (**% monospermia**). Se consideró como el número de ovocitos con penetración monospermica con respecto a los ovocitos penetrados.
- Porcentaje de formación de pronúcleo masculino (**% PNM**). Se calculó como el número de ovocitos que presentaron al menos un pronúcleo masculino sobre el total de ovocitos penetrados.
- Número medio de espermatozoides por ovocito penetrado (**E/O**). Se valoró como el número medio de espermatozoides por ovocito penetrado.

3.10. DISEÑO EXPERIMENTAL

El trabajo experimental se llevó a cabo en cuatro experiencias consecutivas.

- Experiencia 1: Efecto de la complementación del medio de MIV con EGF o con fragmentos de pared folicular (FPF) sobre la maduración *in vitro*, la fecundación *in vitro* y el desarrollo embrionario

El objetivo de esta experiencia fue analizar el efecto del enriquecimiento con EGF o FPF del medio de maduración utilizado como rutina en nuestro laboratorio (medio MIV-

control) sobre la maduración y también sobre la fecundación y el desarrollo embrionario posteriores, con la finalidad de seleccionar aquel medio de MIV idóneo para ser empleado en las siguientes experiencias.

Los tres medios de MIV probados (tablas 2 y 3) fueron los siguientes: MIV-control: NCSU23 libre de BSA enriquecido con 10% de PFF, 0,1 mg/mL de cisteína y 0,05 mg/mL de gentamicina; MIV-EGF: medio MIV-control complementado con 10 ng/mL de EGF; y MIV-FPF: medio MIV-control complementado con 6 fragmentos de pared folicular por pocillo.

Una vez seleccionados los COCs que iban a ser utilizados en la experiencia, se dividieron en tres grupos (Grupo: Control; Grupo: EGF; y Grupo: FPF) que fueron madurados en los diferentes medios de MIV. En las primeras 22 horas de MIV los tres medios fueron complementados con hormonas: 10 UI/mL de eCG y 10 UI/mL de hCG; y en las 22 horas posteriores de maduración los medios no tuvieron complementación hormonal. A partir de aquí, los tres grupos fueron sometidos a FIV y CE en las mismas condiciones experimentales. Los ovocitos fueron desnudados y coincubados durante 4 horas con los espermatozoides a una concentración de $0,5 \times 10^6$ spz/mL en medio de fecundación TBMm. A continuación, se eliminaron los restos de espermatozoides y los posibles cigotos fueron puestos en cultivo en medio NCSU23 con 4 mg/mL de BSA, en un volumen de 500 μ L de medio por pocillo.

La experiencia quedó subdividida en:

- Experiencia 1.1: Efecto de la complementación del medio de MIV con EGF o con fragmentos de pared folicular (FPF) sobre la maduración *in vitro* y la fecundación *in vitro*

A las 18 horas de CE, la mitad de los cigotos de cada grupo fueron fijados y teñidos con Hoechst 3342, y en ellos se valoraron los siguientes parámetros:

- % Maduración nuclear y % PNM: para valorar la maduración nuclear y citoplasmática, respectivamente.

- % Penetración, % Monospermia, y E/O: para evaluar la fecundación.

Asimismo, se evaluaron los siguientes parámetros espermáticos en el semen fresco tras la recogida (volumen del eyaculado, concentración espermática, porcentaje de células en movimiento, calidad del movimiento, grado de aglutinación, grado de morfoanomalías y estado del acrosoma); en el semen refrigerado durante 24 h (porcentaje de células en movimiento, calidad del movimiento y estado del acrosoma); y en el semen diluido en el medio de fecundación (porcentaje de células en movimiento, calidad del movimiento y porcentaje de espermatozoides vivos).

Esta experiencia se llevó a cabo en 7 replicados consecutivos, analizándose los resultados de todos ellos de forma conjunta.

- Experiencia 1.2: Efecto de la complementación del medio de MIV con EGF o con fragmentos de pared folicular (FPF) sobre el desarrollo embrionario *in vitro*

El resto de cigotos se dejó en cultivo hasta completar 125 horas, momento en el que fueron cambiados a medio de cultivo NCSU23 libre de BSA y con 10% de FCS. En éstos se valoró:

- %División, %Mórulas/n, %Mórulas/Divididos, %Blastocistos/n y %Blastocistos/Divididos: para analizar el desarrollo embrionario.

Esta experiencia se llevó a cabo en 7 replicados consecutivos, analizándose los resultados de todos ellos de forma conjunta.

- Experiencia 2: Efecto del medio de FIV y de la concentración espermática sobre la penetración y la poliespermia

El propósito de esta experiencia fue estudiar el efecto de dos medios de FIV: TBMm y TALPm (tablas 4 y 5) y de dos concentraciones espermáticas: $0,5 \times 10^6$ y 1×10^6 spz/mL sobre la penetración y la poliespermia, con el fin de conocer la combinación de

medio de FIV-concentración espermática con la que se obtuvieran menores porcentajes de poliespermia con una penetración aceptable. Este estudio fue diseñado como una experiencia factorial 2x2, dividiéndose en:

- Experiencia 2.1: Efecto del medio de FIV sobre la penetración y la poliespermia

Se estudió el efecto de los medios de fecundación TBMm y TALPm sobre los parámetros de fecundación, para conocer el medio de FIV con el que se alcanzara una menor poliespermia y una penetración aceptable.

- Experiencia 2.2: Efecto de la concentración espermática sobre la penetración y la poliespermia

Asimismo, se estudió el efecto de dos concentraciones espermáticas: $0,5 \times 10^6$ y 1×10^6 spz/mL sobre los parámetros de fecundación, para conocer la concentración espermática más adecuada.

Los COCs fueron madurados con el medio de MIV seleccionado en la experiencia 1 (MIV-EGF). Tras las 44 horas de maduración, los ovocitos fueron divididos en cuatro grupos, según la combinación de medio y concentración espermática a la que fueron sometidos: Grupo: TBM- $0,5 \times 10^6$; Grupo: TBM- 1×10^6 ; Grupo: TALP- $0,5 \times 10^6$; y Grupo: TALP- 1×10^6 . Todos los ovocitos fueron incubados con los espermatozoides durante 4 horas, pasadas las cuales fueron puestos en cultivo en medio NCSU23 con 4 mg/mL de BSA en un volumen de 500 μ L. A las 18 horas tras la FIV, todos los posibles cigotos fueron fijados y teñidos con Hoechst valorándose los siguientes parámetros:

- % maduración nuclear y % PNM: se tomaron en cuenta como control de la eficacia de la maduración nuclear y citoplasmática, respectivamente.
- % penetración, % monospermia y E/O: fueron los parámetros en los que nos fijamos para determinar el grupo con la combinación más óptima.

Al igual que en la experiencia 1, se evaluaron los siguientes parámetros espermáticos en el semen fresco eyaculado (volumen del eyaculado, concentración espermática, porcentaje de células en movimiento, calidad del movimiento, grado de aglutinación, grado de morfoanomalías y estado del acrosoma); en el semen refrigerado durante 24 h (porcentaje de células en movimiento, calidad del movimiento y estado del acrosoma); y en el semen diluido en cada uno de los medios de fecundación TBMm y TALPm (porcentaje de células en movimiento, calidad del movimiento y porcentaje de espermatozoides vivos).

Se realizaron 6 replicados consecutivos y los resultados de todos ellos se analizaron de forma conjunta.

- Experiencia 3: Efecto del método de cocultivo de los ovocitos con los espermatozoides sobre la penetración y la poliespermia

El objetivo de esta experiencia fue comparar el efecto de dos métodos diferentes de cocultivo de los ovocitos con los espermatozoides sobre la penetración y la poliespermia para, al igual que en la experiencia anterior, conocer con cuál de ellos se obtenían menores porcentajes de poliespermia con tasas de penetración aceptables.

Los COCs fueron madurados con el medio de MIV seleccionado en la experiencia 1 (MIV-EGF). Tras las 44 horas de maduración, los ovocitos fueron divididos en dos grupos, que fueron incubados con los espermatozoides con la combinación de medio y concentración seleccionada en la experiencia 2 (medio TBMm y 1×10^6 spz/mL: TBM-1).

A uno de los grupos (Grupo: Control) se le aplicó el método de cocultivo estándar de nuestro laboratorio, es decir, la incubación durante 4 horas con el total de la concentración espermática. Mientras que al otro grupo (Grupo: Método en dos pasos) se le aplicó el método de cocultivo en dos pasos, que consistió en una primera incubación de 10 minutos con el total de la concentración espermática, seguida del paso de los ovocitos con los espermatozoides adheridos a su ZP a una microgota con medio de fecundación libre de espermatozoides, en la que fueron incubados durante 4 horas más.

Tras el cocultivo, los posibles cigotos de ambos grupos fueron puestos en cultivo en medio NCSU23 con 4 mg/mL de BSA en un volumen de 500 μ L. A las 18 horas post-fecundación, todos los posibles cigotos fueron fijados y teñidos con Hoechst, valorándose los mismos parámetros de en la experiencia 2:

- % maduración nuclear, % PNM , % penetración, % monospermia, y E/O.

Como en las experiencias anteriores, se evaluaron los siguientes parámetros espermáticos en el semen fresco eyaculado (volumen del eyaculado, concentración espermática, porcentaje de células en movimiento, calidad del movimiento, grado de aglutinación, grado de morfoanomalías y estado del acrosoma); en el semen refrigerado durante 24 h (porcentaje de células en movimiento, calidad del movimiento y estado del acrosoma); y en el semen diluido en el medio de fecundación (porcentaje de células en movimiento, calidad del movimiento y porcentaje de espermatozoides vivos).

Esta experiencia se llevó a cabo en 6 replicados consecutivos, analizándose los resultados de todos ellos de forma conjunta.

- Experiencia 4: Efecto de la complementación del medio de CE con aminoácidos y de la relación de embriones/volumen de medio sobre la división y el desarrollo embrionario *in vitro*

En esta experiencia se examinó el efecto de dos modificaciones del sistema de CE estándar de nuestro laboratorio: la complementación del medio de cultivo con aminoácidos (esenciales y no esenciales) y la reducción del volumen de medio por embrión, sobre la división embrionaria y el desarrollo hasta el estadio de blastocisto. La finalidad de este estudio fue averiguar con cuál de las distintas combinaciones de medio de cultivo-volumen de medio se conseguía una mayor eficacia en desarrollo embrionario preimplantacional. Al igual que en la experiencia 2, este estudio fue diseñado como una experiencia factorial 2x2, dividiéndose en:

- Experiencia 4.1: Efecto de la complementación del medio de CE con aminoácidos esenciales y no esenciales sobre la división y el desarrollo embrionario *in vitro*

Se estudió el efecto del enriquecimiento del medio de cultivo con aminoácidos (esenciales y no esenciales (BME y MEM) sobre la división y el desarrollo embrionario hasta mórula y blastocisto.

- Experiencia 4.2: Efecto de la relación de embriones/volumen de medio sobre la división y el desarrollo embrionario *in vitro*

Se estudió el efecto sobre la división y desarrollo embrionario preimplantacional del cultivo de embriones en 500 μL de medio, volumen de cultivo estándar en nuestro laboratorio, o en microgotas de 50 μL de medio, reduciendo de este modo el volumen de medio por embrión.

La MIV y FIV de los ovocitos se realizó incluyendo las modificaciones estudiadas en las anteriores experiencias con las que se habían obtenido mejores resultados. Por lo tanto, todos los ovocitos fueron madurados en el medio de maduración MIV-EGF, e incubados con los espermatozoides en el medio de fecundación TBMm, a una concentración de 1×10^6 spz/mL y con el método de cocultivo en dos pasos.

Tras 4 horas de cocultivo con los espermatozoides, los posibles cigotos fueron divididos en cuatro grupos según si el medio de cultivo utilizado se enriquecía (NCSU23aa) o no (NCSU23) con aminoácidos (tabla 7); y si el cultivo de embriones se realizaba, como anteriormente, en 500 μL de medio cubierto de aceite mineral, o en microgotas de 50 μL de medio cubiertas también de aceite mineral.

De este modo, los cuatro grupos quedaron constituidos de la siguiente manera: Grupo: NCSU23-500 (sin aminoácidos y en un volumen de 500 μL); Grupo: NCSU23-50 (sin aminoácidos y en microgotas de 50 μL); Grupo: NCSU23aa-500 (con aminoácidos y en un volumen de 500 μL); y Grupo: NCSU23aa-50 (con aminoácidos y en microgotas de

50 μ L). Todos los medios de cultivo fueron enriquecidos con 4 mg/mL de BSA durante las primeras 125 horas de incubación, y con 10% de FCS a partir de entonces (tabla 7).

En cada uno de los grupos se evaluaron los siguientes parámetros:

- %División, %Mórulas/n, %Mórulas/Divididos, %Blastocistos/n, %Blastocistos/Divididos y %Blastocistos/Mórulas.

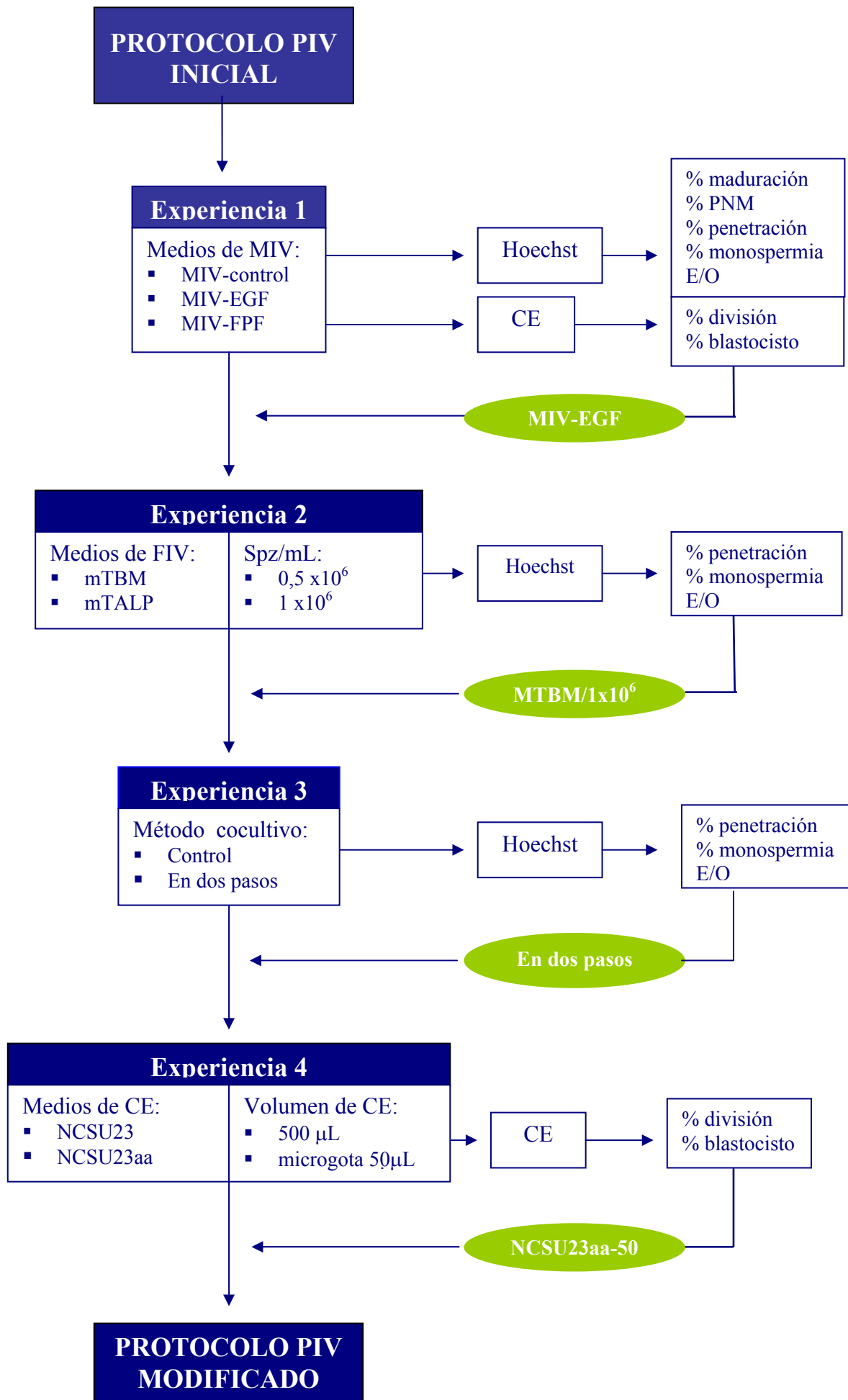
Se evaluaron, como en las experiencias anteriores, los siguientes parámetros espermáticos en el semen fresco tras la eyaculación (volumen del eyaculado, concentración espermática, porcentaje de células en movimiento, calidad del movimiento, grado de aglutinación, grado de morfoanomalías y estado del acrosoma); en el semen refrigerado durante 24 h (porcentaje de células en movimiento, calidad del movimiento y estado del acrosoma); y en el semen diluido en el medio de fecundación (porcentaje de células en movimiento, calidad del movimiento y porcentaje de espermatozoides vivos).

Esta experiencia se llevó a cabo en 8 replicados consecutivos, analizándose los resultados de todos ellos de forma conjunta.

3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores de maduración nuclear, penetración, formación de pronúcleo masculino, división, mórulas y blastocistos se expresan como porcentaje medio \pm SEM (error estándar de la media). El número de espermatozoides por ovocito penetrado (E/O) se expresa como número medio \pm SEM (error estándar de la media). Las medias, tanto de los porcentajes como del E/O, fueron calculadas por mínimos cuadrados para tener en cuenta el diferente número de observaciones en cada tratamiento.

Para todo el análisis estadístico se utilizó el procedimiento GLM (*General Linear Model*) del paquete estadístico SAS (SAS, 1998). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquéllas que alcanzaron niveles de probabilidad de $P < 0,05$.



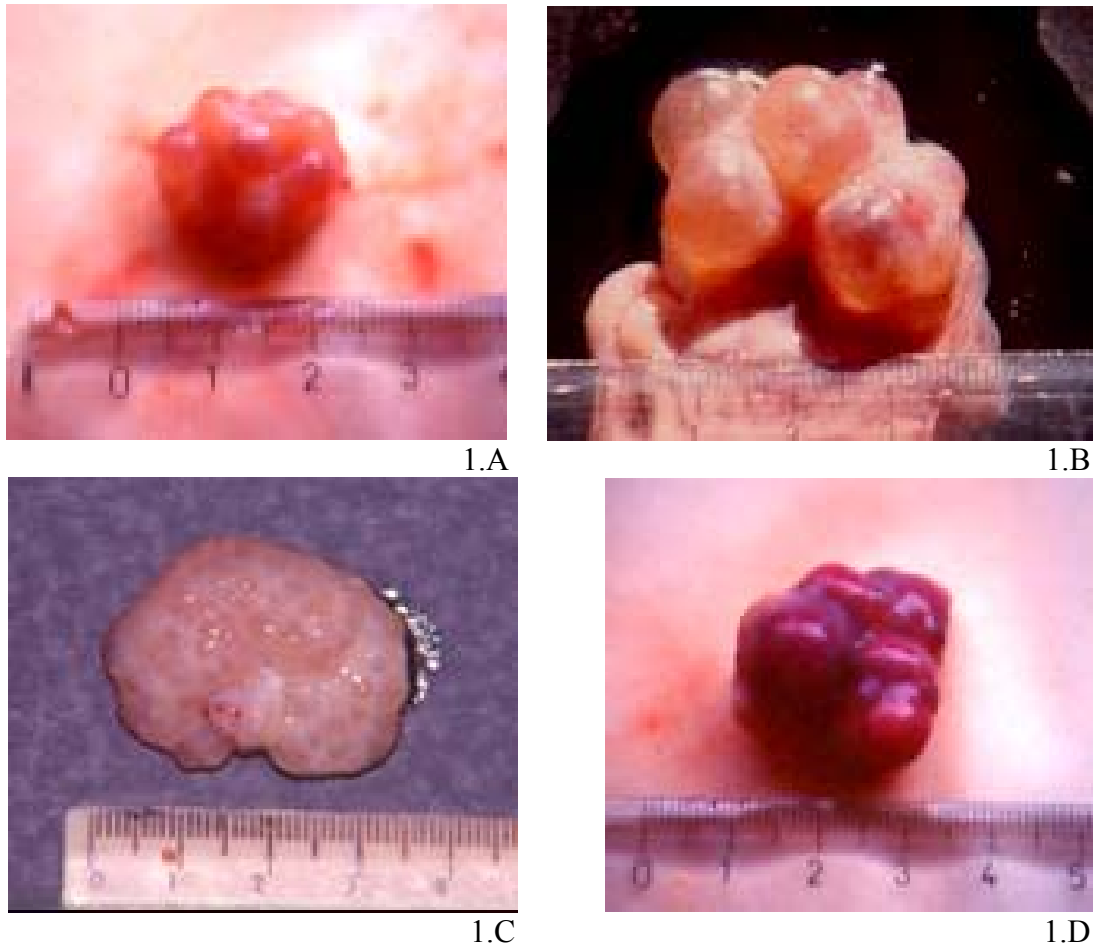


Figura 1. 1.A: Ovario con desarrollo folicular adecuado. 1.B: Ovario con folículos grandes (diámetro >7 mm). 1.C: Ovario con folículos pequeños (diámetro <3mm). 1.D: Ovario con presencia de cuerpos lúteos.

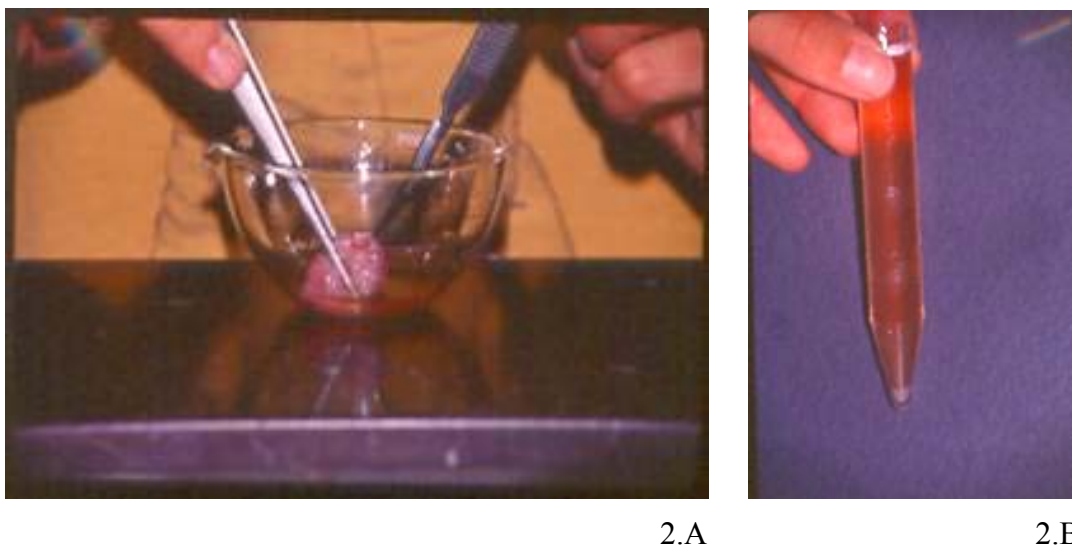


Figura 2. 2.A: Punción de folículos ováricos con bisturí. 2.B: Decantación de COCs diluidos en PBSm.



3.1

3.2

Figura 3. Selección de COCs 3.1: Estereomicroscopio y sistema de manipulación de COCS, ovocitos y embriones. 3.2: Detalle de pipeta Pasteur preparada para la manipulación y placa de Petri.



4.1

4.2

4.3

Figura 4. Morfología de los COCs porcinos. 4.1: Ovocito rodeado por más de tres capas de células del cúmulo y pedúnculo de unión a la pared folicular. 4.2: Ovocito rodeado por menos de tres capas de células del cúmulo. 4.3: Ovocito desnudo.

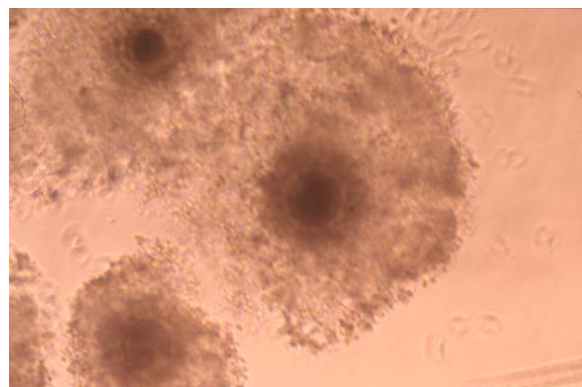


Figura 5. COC porcino en el que se aprecia la expansión del cúmulo.

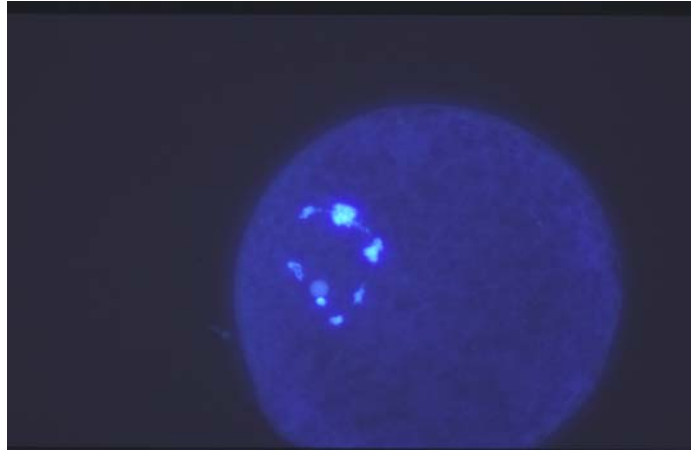


Figura 6. Ovocito porcino en estadio de rotura de vesícula germinal. Tinción con Hoechst 33342. Microscopio de epifluorescencia, 400 aumentos.

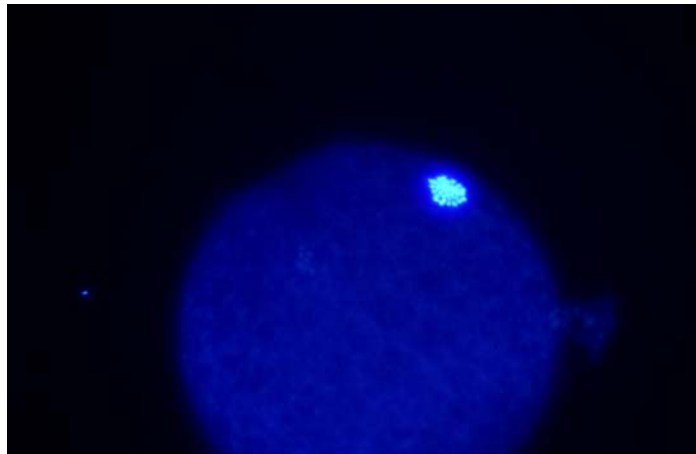


Figura 7. Ovocito porcino en estadio de metafase I. Tinción con Hoechst 33342. Microscopio de epifluorescencia, 400 aumentos.

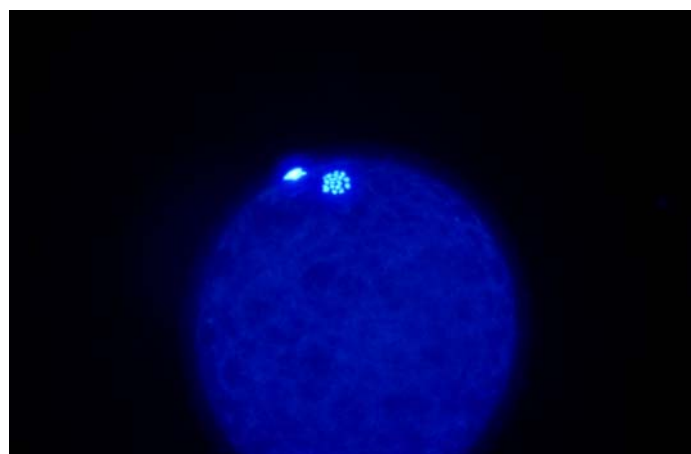


Figura 8. Ovocito porcino en estadio de metafase II. Tinción con Hoechst 33342. Microscopio de epifluorescencia, 400 aumentos.

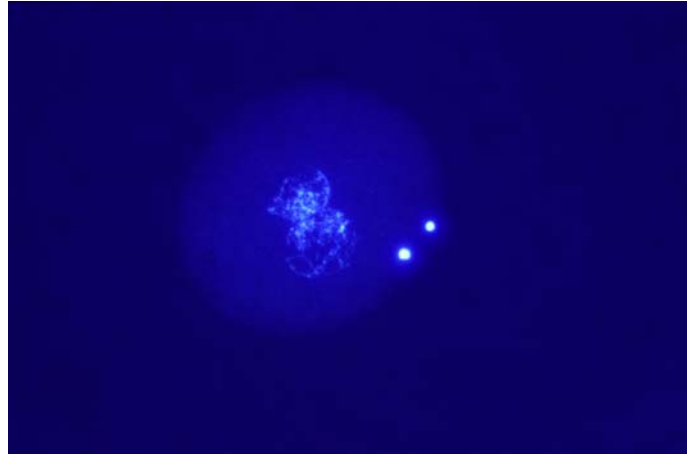


Figura 9. Ovocito porcino monospermico con dos pronúcleos y dos corpúsculos polares. Tinción con Hoechst 33342. Microscopio de epifluorescencia, 400 aumentos.

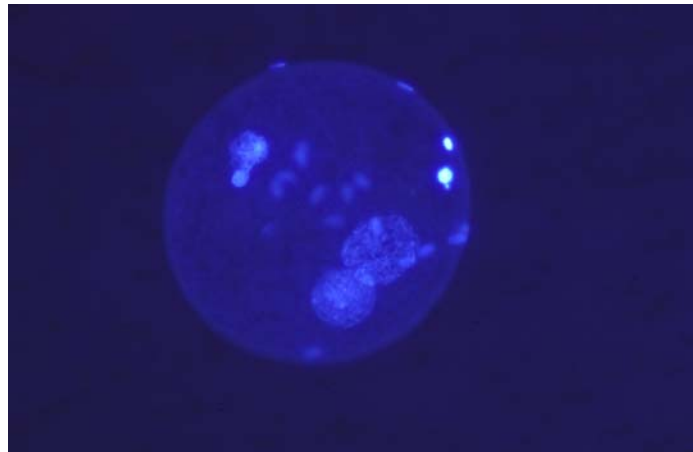


Figura 10. Ovocito porcino poliespermico con tres pronúcleos y varias cabezas descondensadas. Tinción con Hoechst 33342. Microscopio de epifluorescencia, 400 aumentos.

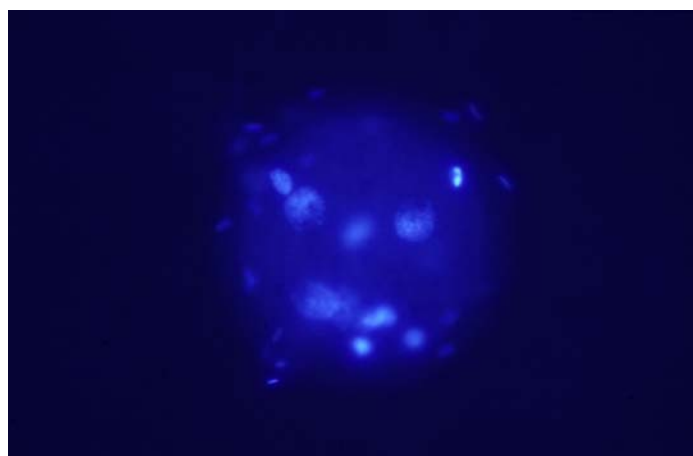


Figura 11. Ovocito porcino poliespermico con varios pronúcleos y cabezas descondensadas. Tinción con Hoechst 33342. Microscopio de epifluorescencia, 400 aumentos.

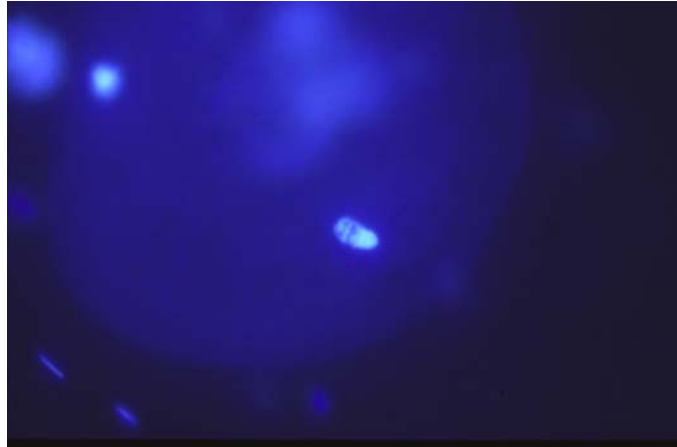


Figura 12. Ovocito porcino con cabeza espermática descondensada. Tinción con Hoechst 33342. Microscopio de epifluorescencia, 600 aumentos.



Figura 13. Espermatozoide porcino alterado emitiendo fluorescencia roja. Tinción con Diacetato de carboxifluoresceína-Ioduro de propidio. Microscopio de epifluorescencia, 600 aumentos.

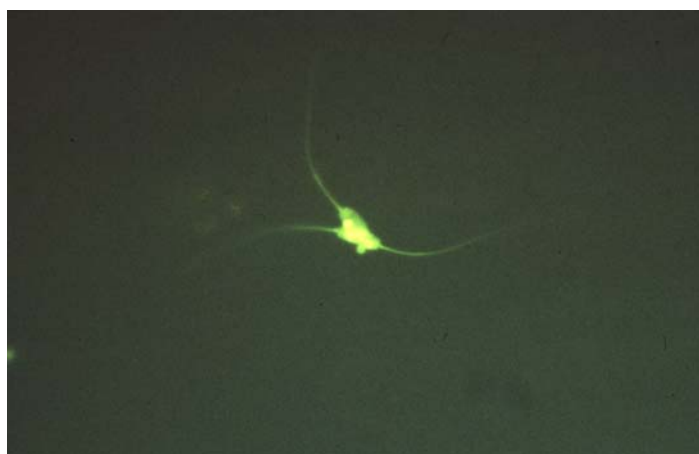


Figura 14. Tres espermatozoides porcinos funcionales emitiendo fluorescencia verde. Tinción con Diacetato de carboxifluoresceína-Ioduro de propidio. Microscopio de epifluorescencia, 600 aumentos.

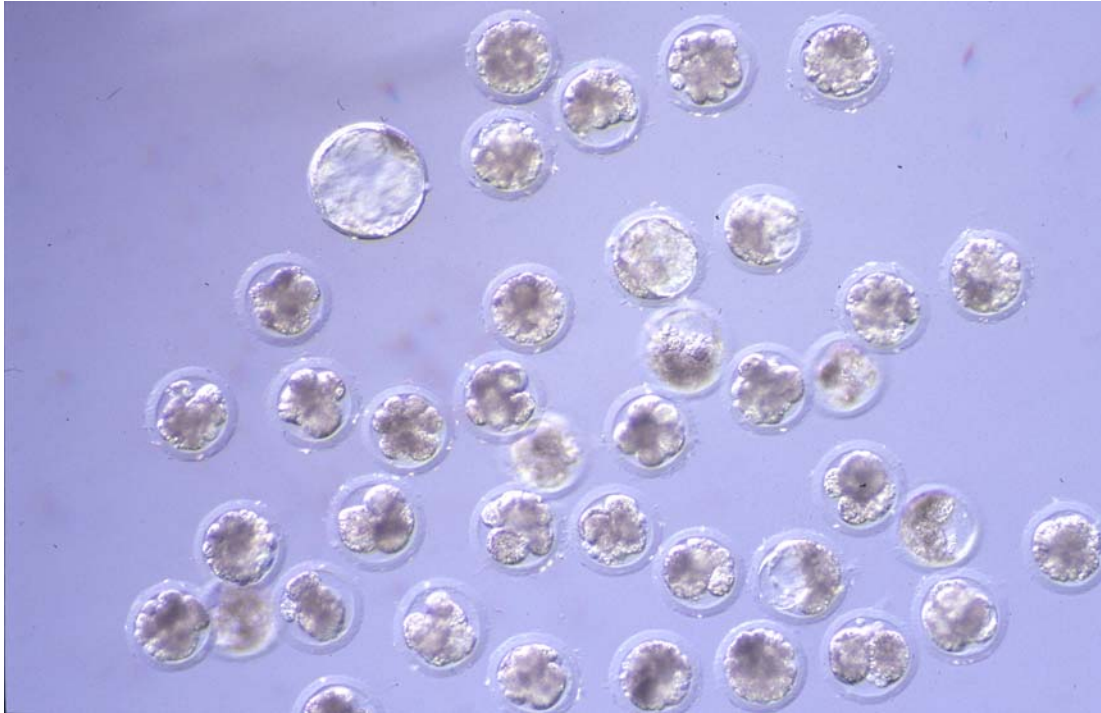
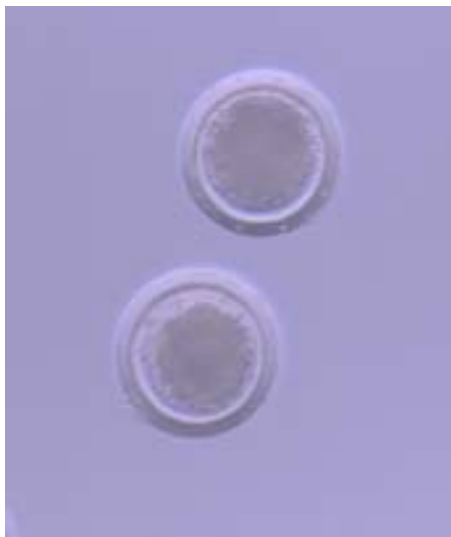


Figura 15. Grupo de embriones porcinos en diferentes estadios de desarrollo. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 100 aumentos.



16.A



16.B

Figura 16: 16.A. Embriones porcinos de una célula. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 100 aumentos. 16.B. Embrión porcino de dos células. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 100 aumentos.

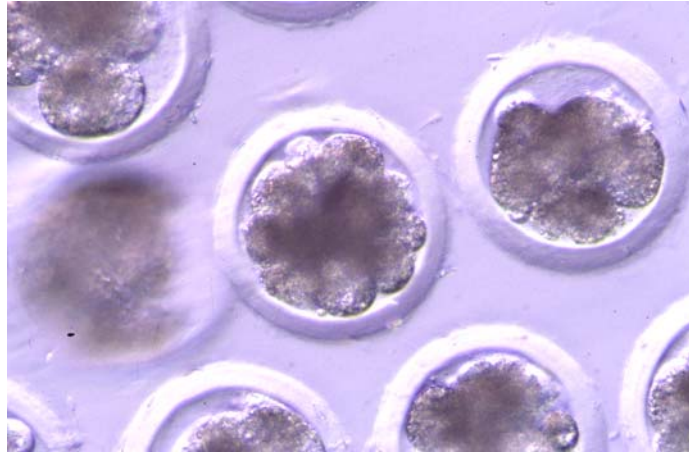


Figura 17. Embrión porcino en estadio de mórula. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 200 aumentos.

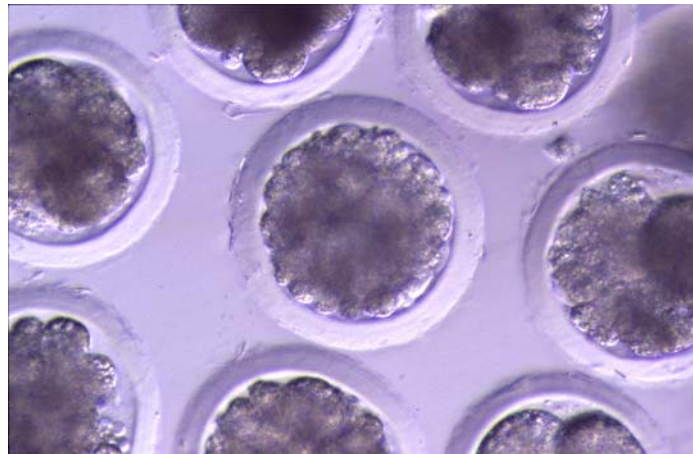


Figura 18. Embrión porcino en estadio de mórula compacta. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 200 aumentos.

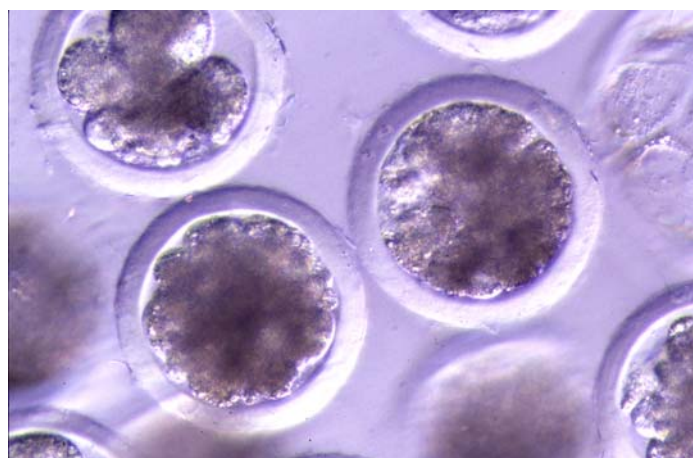


Figura 19. Embrión porcino en estadio de mórula compacta, a la izquierda; y embrión porcino iniciando la formación del blastocelo, a la derecha. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 200 aumentos.



Figura 20. Blastocisto porcino con pequeño blastocele. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 200 aumentos.



Figura 21. Blastocisto porcino con blastocele de mayor tamaño. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 200 aumentos.



Figura 22. Blastocisto porcino cuyo blastocele ocupa casi la totalidad del embrión, en la parte superior se aprecia la masa celular interna. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 200 aumentos.

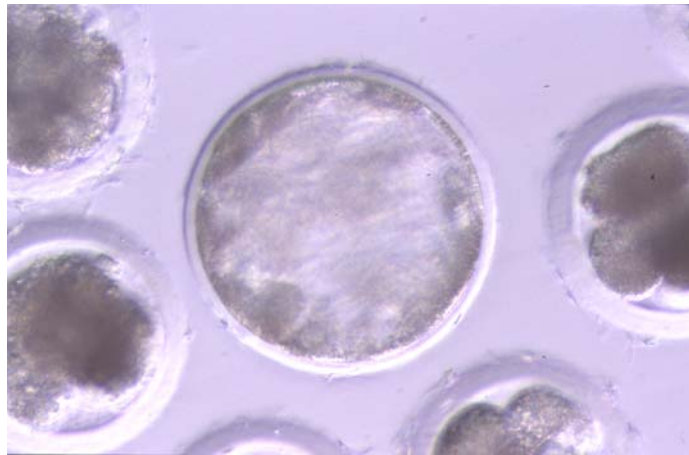


Figura 23. Blastocisto porcino expandido. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 200aumentos.



Figura 24. Blastocisto porcino expandido. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 400aumentos.

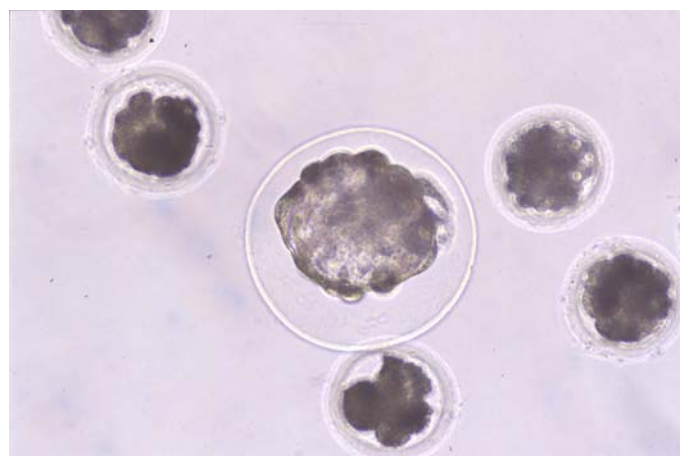


Figura 25. Blastocisto porcino expandido y colapsado, se aprecia un mayor espacio perivitelino. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 200aumentos.



Figura 26. Blastocisto porcino eclosionando, en la parte inferior se aprecia la rotura de la zona pelúcida y la salida del embrión. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 400 aumentos.

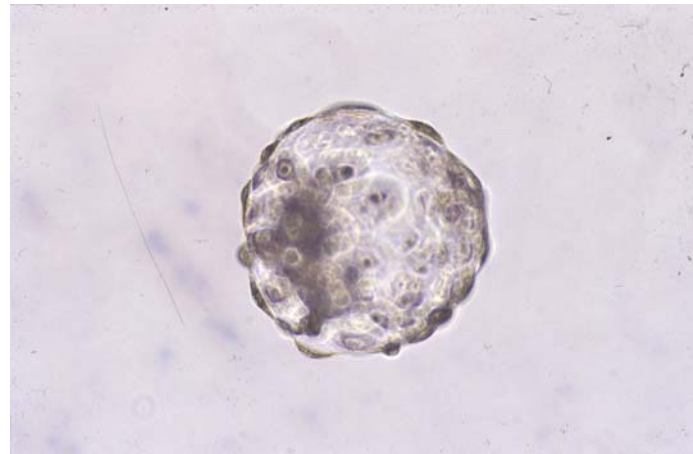


Figura 27. Blastocisto porcino totalmente eclosionado, desprovisto de la zona pelúcida. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 200 aumentos.

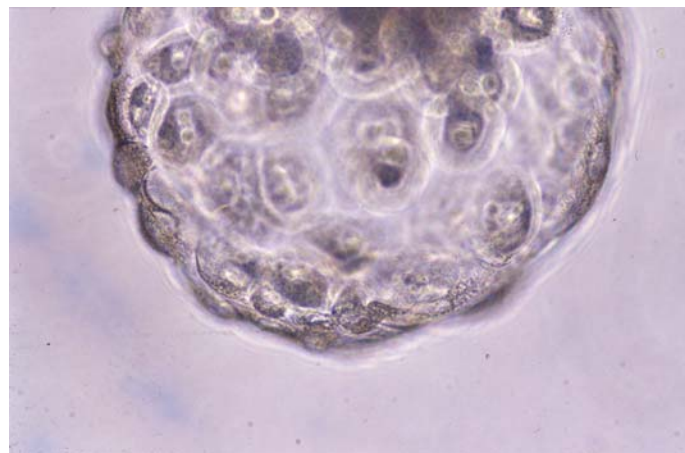


Figura 28. Detalle de un blastocisto porcino eclosionado, se aprecian las células del trofoblasto. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 400 aumentos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

A continuación se exponen los resultados alcanzados en cada una de las cuatro experiencias que constituyen el presente trabajo. Los datos fueron analizados siguiendo la metodología descrita.

4.1. EFECTO DE LA COMPLEMENTACIÓN DEL MEDIO DE MIV CON FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF) O CON FRAGMENTOS DE PARED FOLICULAR (FPF) SOBRE LA MADURACIÓN *IN VITRO*, LA FECUNDACIÓN *IN VITRO* Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO*

Los resultados de esta experiencia se dividen en el efecto del medio de MIV sobre la maduración y fecundación, valorados en los ovocitos fijados tras la FIV, y sobre el desarrollo embrionario, que se evaluó en los ovocitos dejados en cultivo.

4.1.1. Efecto de la complementación del medio de MIV con EGF o con FPF sobre la maduración *in vitro* y la fecundación *in vitro*

Los resultados en el porcentaje de maduración nuclear no se vieron afectados por la suplementación del medio de MIV con EGF (92,5%) o con FPF (90,2%) respecto al medio control (91,4%). Sin embargo, el porcentaje de formación de PNM, parámetro con el que se evaluó el grado de maduración citoplasmática, sí fue significativamente superior al añadir EGF (93,6%; $P < 0,0001$) y FPF (88%; $P = 0,006$) en comparación con el obtenido con el medio de MIV control (73,6%) (Tabla 8).

En cuanto a los resultados de fecundación, no se observaron diferencias significativas entre los tres tratamientos ni en el porcentaje de penetración, que se situó en torno al 50%, ni en el número medio de espermatozoides por ovocito, que osciló entre 1,6 y 1,8, tal y como se refleja en la tabla 8. Por el contrario, la suplementación con EGF incrementó de manera significativa ($P = 0,024$) el porcentaje de monospermia respecto al medio control (67,2% vs 52.6%).

Tabla 8. Media y error estándar de la media para los distintos parámetros de maduración y fecundación de los ovocitos madurados con los tres tipos de medio de MIV, en 7 replicados.

Medio MIV	n	%	%	%	%	E/O
		Maduración Nuclear (n)	Penetración (madurados)	Monospermia (penetrados)	PNM (penetrados)	
Control	249	91,4 ± 1,8 ^a	53,2 ± 3,1 ^a	52,6 ± 4,6 ^a	73,6 ± 3,6 ^a	1,7 ± 0,1 ^a
FPF	243	90,2 ± 1,7 ^a	50,1 ± 3,0 ^a	59,4 ± 4,9 ^{ab}	88,0 ± 3,8 ^b	1,8 ± 0,1 ^a
EGF	258	92,5 ± 1,7 ^a	50,2 ± 3,0 ^a	67,2 ± 4,6 ^b	93,6 ± 3,6 ^b	1,6 ± 0,1 ^a

Control: Medio NCSU23 libre de BSA con 10% de PFF y 0,1 mg/mL de cisteína

FPF: Medio control complementado con 6 fragmentos de pared folicular (FPF)

EGF: Medio control complementado con 10 ng/mL de EGF

n: número de ovocitos fijados

PNM: formación de pronúcleo masculino

E/O: número medio de espermatozoides por ovocito penetrado

a, b: superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

Tabla 9. Media y error estándar de la media para los distintos parámetros espermáticos del semen empleado en la experiencia 1, en 7 replicados.

Parámetros espermáticos	Semen fresco	Semen refrigerado	Semen diluido en TBMm
Volumen de la fracción rica del eyaculado (mL)	60,2±12,3		
Concentración espermática (10 ⁷ spz/mL)	84,8±17,1		
Espermatozoides móviles (%)	80,8±2,8	78,5±6,5	75,4±5,4
Calidad movimiento (0-5)	3,9±0,1	3,0±0	5±0
Aglutinación (0-2)	0,8±0,3		
Morfoanomalías (%)	4,6±2,2		
Acrosomas normales (%)	95,2±1,9	94,7±2,3	
Espermatozoides funcionales (%)			77,2±3,3

En la tabla 9 se muestran los resultados de los diferentes parámetros espermáticos analizados en el semen eyaculado recién recogido (semen fresco), en el semen diluido en medio de conservación y mantenido a 15°C durante 24 horas (semen refrigerado) y en el semen diluido en el medio de fecundación TBMm e incubado durante 5-10 minutos en condiciones de 39°C de temperatura y 5% de CO₂ en atmósfera saturada de humedad (semen diluido en TBMm). Los resultados obtenidos permitieron considerar como válido para su utilización en la fecundación *in vitro* al semen empleado para cada uno de los 7 replicados.

4.1.2. Efecto de la complementación del medio de MIV con EGF o con FPF sobre el desarrollo embrionario *in vitro*

Aunque no se observaron diferencias en la tasa de división a las 48 h entre ninguno de los tratamientos, en los ovocitos madurados en medio complementado con EGF el porcentaje de mórulas (31,4% vs 22,4%, $P=0,026$) y de blastocistos respecto al total (4,3%

vs 1%, $P=0,028$) fueron significativamente superiores comparado con el control, encontrando asimismo una tendencia a la significación en la tasa de desarrollo a mórula ($P=0,082$) y a blastocisto ($P=0,056$) respecto los divididos entre estos dos tratamientos. La complementación del medio de maduración con FPF no mostró ninguna diferencia significativa respecto a los otros dos tratamientos, en relación a los parámetros de desarrollo embrionario evaluados (Tabla 10).

Tabla 10. Media y error estándar de la media para los distintos parámetros de desarrollo embrionario tras la FIV de los ovocitos madurados con los tres tipos de medio de MIV, en 6 replicados.

Medio MIV	n	% División (n)	% Mórulas (n)	% Mórulas (divididos)	% Blastocistos (n)	% Blastocistos (divididos)
Control	246	42,1 ± 3,3 ^a	22,4 ± 2,9 ^a	55,0 ± 4,9 ^{a*}	1,0 ± 1,1 ^a	2,5 ± 2,6 ^{a+}
FPF	259	45,7 ± 3,1 ^a	25,8 ± 2,8 ^{ab}	60,0 ± 4,3 ^a	2,7 ± 1,0 ^{ab}	6,5 ± 2,2 ^a
EGF	265	48,4 ± 3,1 ^a	31,4 ± 2,8 ^b	66,2 ± 4,2 ^{a*}	4,3 ± 1,0 ^b	8,9 ± 2,2 ^{a+}

Control: Medio NCSU23 libre de BSA con 10% de PFF y 0,1 mg/mL de cisteína

FPF: Medio control complementado con 6 fragmentos de pared folicular (FPF)

EGF: Medio control complementado con 10 ng/mL de EGF

n: número de presuntos cigotos puestos a cultivar

a, b: superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P<0,05$)

*: tendencia a la significación ($P=0,082$)

+: tendencia a la significación ($P=0,056$)

Figura 29. Efecto de la complementación del medio de MIV con EGF o con FPF sobre la maduración y la fecundación *in vitro*

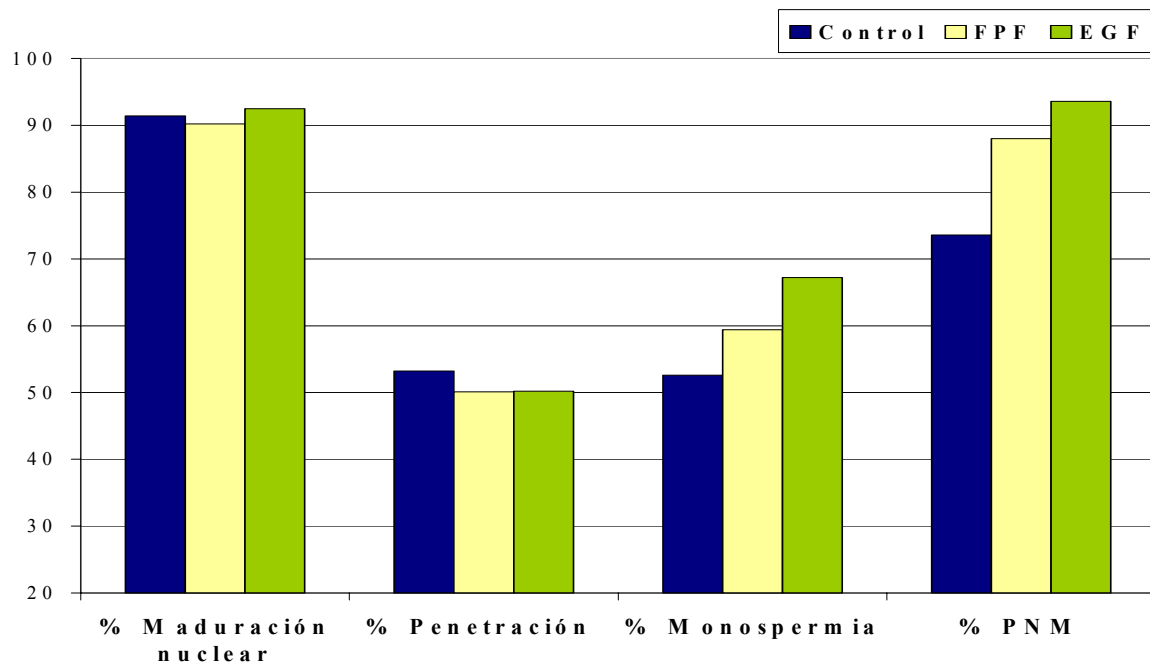
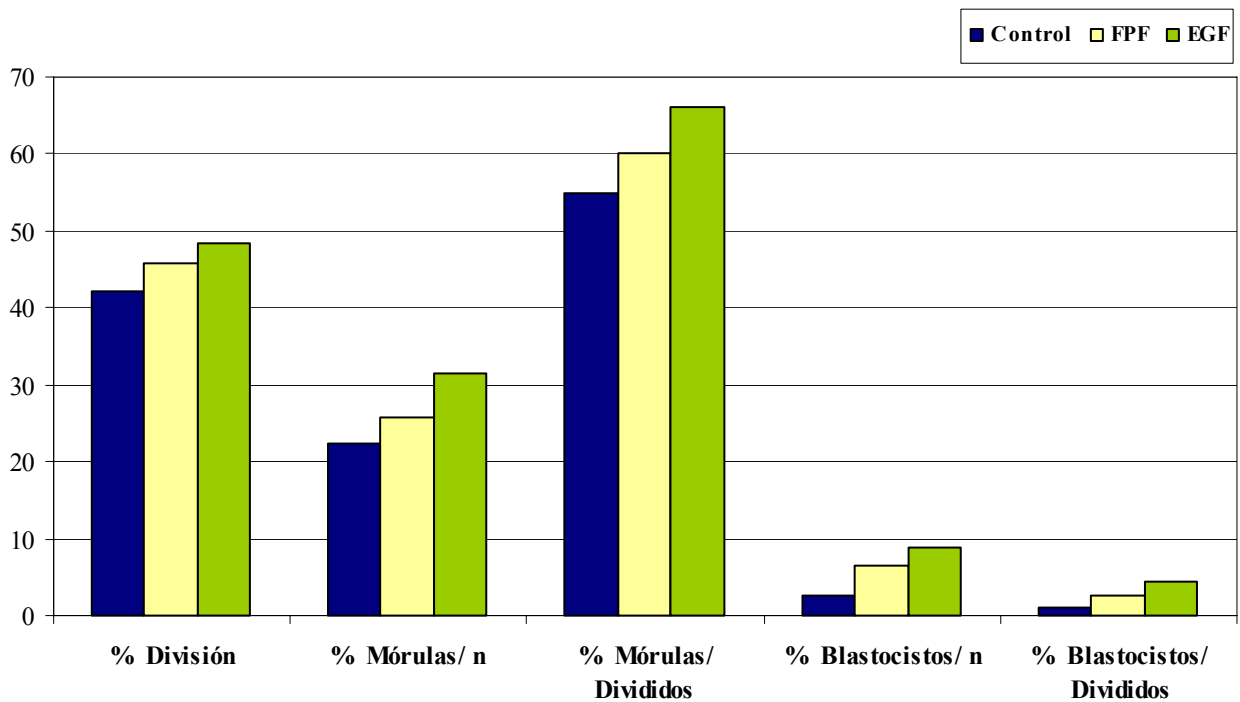


Figura 30. Efecto de la complementación del medio de MIV con EGF o con FPF sobre el desarrollo embrionario *in vitro*



4.2. EFECTO DEL MEDIO DE FIV Y DE LA CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA SOBRE LA PENETRACIÓN Y LA POLIESPERMIA

El empleo del medio TALPm en la FIV dio lugar a tasas de penetración significativamente más elevadas ($P<0,0005$) que el del TBMm. Si nos centramos en el medio TALPm, la penetración alcanzada al utilizar la concentración de 1×10^6 spz/mL fue significativamente más elevada que con la de $0,5 \times 10^6$ spz/mL (98,8% vs 90,7%, $P=0,024$). El mismo comportamiento se observó con respecto a la concentración de semen al emplear el medio TBMm, obteniendo un 77,7% de penetraciones con 1×10^6 spz/mL frente a un 52,9% con $0,5 \times 10^6$ spz/mL ($P<0,0001$) (Tabla 11).

En cambio, el porcentaje de monospermia fue significativamente menor con el medio TALPm frente al TBMm ($P<0,0001$). No se apreciaron diferencias significativas dentro de cada medio de FIV según la concentración empleada, siendo la tasa de monospermia de 15,3% con la combinación TALP-0,5 vs 11,7% con la TALP-1, y de 54,6% con TBM-0,5 vs 45,6% con TBM-1, aunque entre estos últimos se observó una tendencia a la significación ($P=0,064$). De igual modo, no fueron significativas las diferencias en el número de espermatozoides por ovocito penetrado (E/O) dentro de cada medio entre las dos concentraciones espermáticas empleadas (6,9 en TALP-0,5 vs 7,9 en TALP-1; y 1,7 en TBM-0,5 vs 2,1 en TBM-1), aunque sí lo fueron entre los dos medios, independientemente de la concentración ($P<0,01$) (Tabla 11).

En la tabla 11 también quedan reflejados los valores de los parámetros evaluados como control de la para ninguno de los cuatro tratamientos, siendo tanto el porcentaje de maduración nuclear como el de formación de PNM superiores al 94% en todos los casos.

Tabla 11. Media y error estándar de la media para los distintos parámetros de maduración y fecundación de los ovocitos fecundados con los dos tipos de medio de FIV y las dos concentraciones de espermatozoides, en 6 replicados.

Medio FIV- spz/mL	n	% Maduración Nuclear (n)	% Penetración (madurados)	% Monospermia (penetrados)	% PNM (penetrados)	E/O
TALP - 0,5	236	96,9 ± 1,2 ^a	90,7 ± 2,5 ^a	15,3 ± 2,9 ^a	94,8 ± 1,7 ^a	6,9 ± 1,1 ^a
TALP - 1	209	97,0 ± 1,2 ^a	98,8 ± 2,5 ^b	11,7 ± 2,7 ^a	96,1 ± 1,6 ^a	7,9 ± 1,1 ^a
TBM - 0,5	227	96,3 ± 1,2 ^a	52,9 ± 2,6 ^c	54,6 ± 3,8 ^{b*}	95,4 ± 2,3 ^a	1,7 ± 1,1 ^b
TBM - 1	212	97,5 ± 1,2 ^a	77,7 ± 2,5 ^d	45,6 ± 3,1 ^{b*}	94,7 ± 1,8 ^a	2,1 ± 1,1 ^b

TALP - 0,5: Medio TALPm y 0,5x10⁶ spz/mL

TALP - 1: Medio TALPm y 1x10⁶ spz/mL

TBM - 0,5: Medio TBMm y 0,5x10⁶ spz/mL

TBM - 1: Medio TBMm y 1x10⁶ spz/mL

n: número de ovocitos fijados

PNM: formación de pronúcleo masculino

E/O: número medio de espermatozoides por ovocito penetrado

a, b, c, d: superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

*: tendencia a la significación ($P = 0,064$)

Figura 31. Efecto del medio de FIV y de la concentración espermática sobre la penetración y la poliespermia

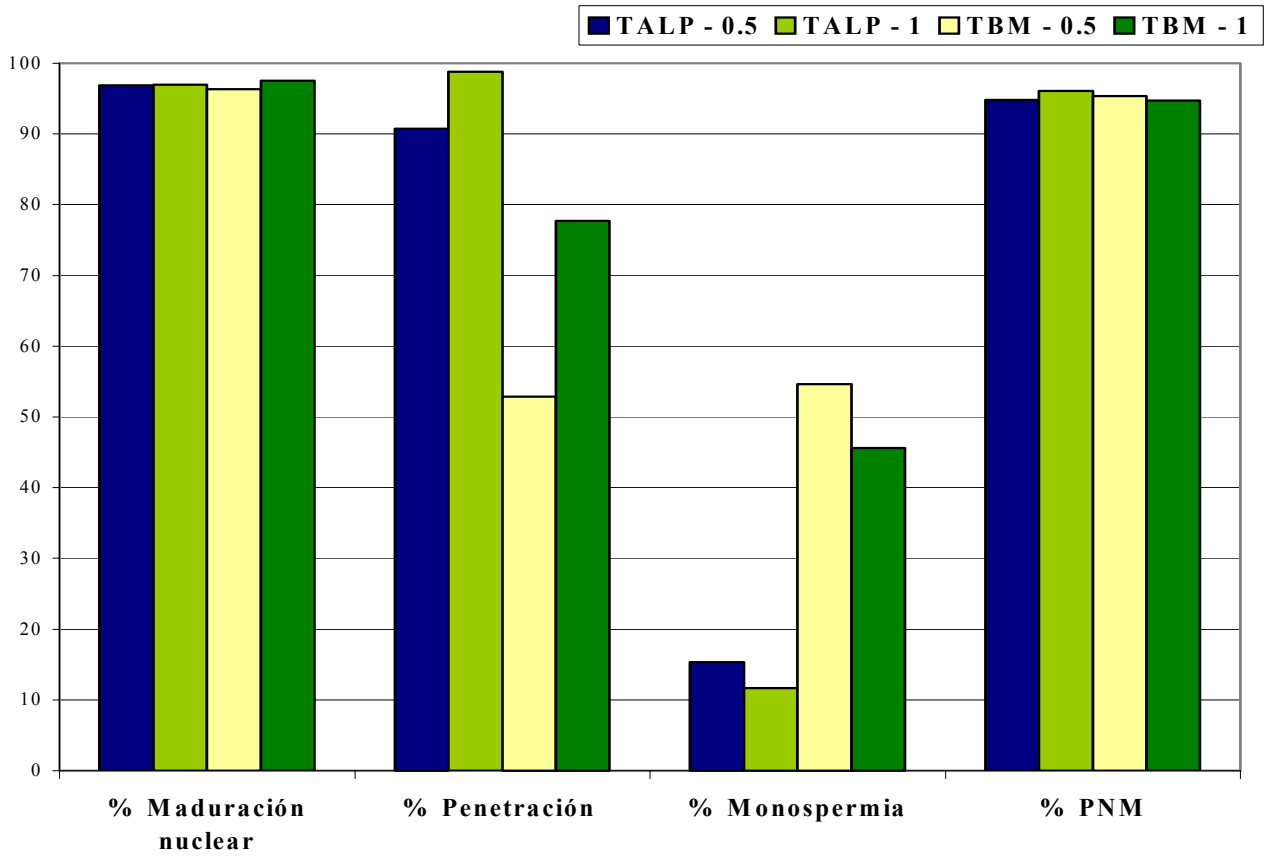


Tabla 12. Media y error estándar de la media para los distintos parámetros espermáticos del semen empleado en la experiencia 2, en 6 replicados.

Parámetros Espermáticos	Semen fresco	Semen refrigerado	Semen diluido en TBMm	Semen diluido en TALPm
Volumen de la fracción rica del eyaculado (mL)	68,8±18,6			
Concentración espermática (10 ⁷ spz/mL)	100±18,2			
Espermatozoides móviles (%)	82,8±4,8	78,9±5,7	73,8±3,2	78,2±4,3
Calidad movimiento (0-5)	3,9±0,2	3,0±0	4,8±0,4	4,7±0,4
Aglutinación (0-2)	0,9±0,3			
Morfoanomalías (%)	4,8±2,1			
Acrosomas normales (%)	96,1±2,4	94,8±2		
Espermatozoides funcionales (%)			77,0±3,3	77,8±3,8

En la tabla 12 se muestran los resultados de los diferentes parámetros espermáticos analizados en el semen eyaculado recién recogido (semen fresco), en el semen diluido en medio de conservación y mantenido a 15°C durante 24 horas (semen refrigerado) y en el semen diluido en cada uno de los medios de fecundación TBMm y TALPm e incubado durante 5-10 minutos en condiciones de 39°C de temperatura y 5% de CO₂ en atmósfera saturada de humedad (semen diluido en TBMm o semen diluido en TALPm). Los resultados obtenidos permitieron considerar como válido para su utilización en la fecundación *in vitro* al semen empleado para cada uno de los 6 replicados.

4.3. EFECTO DEL MÉTODO DE COCULTIVO DE LOS OVOCITOS CON LOS ESPERMATOZOIDES SOBRE LA PENETRACIÓN Y LA POLIESPERMIA

Tanto el porcentaje de penetración ($P=0,001$) como el de monospermia ($P<0,0001$) fueron significativamente diferentes entre los dos métodos de cocultivo empleados. Con el método control se logró una tasa de penetración más elevada, 76% vs 66,6%, que con el método en los pasos; mientras que este último dio una tasa de monospermia que casi duplicó la alcanzada con el método control (63,8% vs 35,6%). El número de espermatozoides por ovocito penetrado fue superior con el método control (2,8 vs 1,7; $P=0,045$) (Tabla 13).

Al igual que ocurrió en el experimento anterior, no se produjeron diferencias entre los dos tratamientos respecto a la tasa de maduración nuclear y de formación de PNM.

Tabla 13. Media y error estándar de la media para los distintos parámetros de maduración y fecundación de los ovocitos fecundados con los dos tipos de métodos de cocultivo espermatozoides-ovocitos, en 6 replicados.

Método	n	% Maduración Nuclear (n)	% Penetración (madurados)	% Monospermia (penetrados)	% PNM (penetrados)	E/O
Control	367	94,5 ± 1,2 ^a	76,0 ± 2,1 ^a	35,6 ± 3,0 ^a	90,7 ± 2,0 ^a	2,8 ± 0,3 ^a
2-pasos	372	92,7 ± 1,2 ^a	66,6 ± 2,1 ^b	63,8 ± 3,4 ^b	85,5 ± 2,3 ^a	1,7 ± 0,3 ^b

Control: 4 h con 1x10⁶ spz/mL

2-pasos: 10 min con 1x10⁶ spz/mL y 4 h con los espermatozoides adheridos a la ZP

n: número de ovocitos fijados

PNM: formación de pronúcleo masculino

E/O: número medio de espermatozoides por ovocito penetrado

a, b: superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P<0,05$)

Figura 32. Efecto del método de cocultivo de los ovocitos con los espermatozoides sobre la penetración y la poliespermia

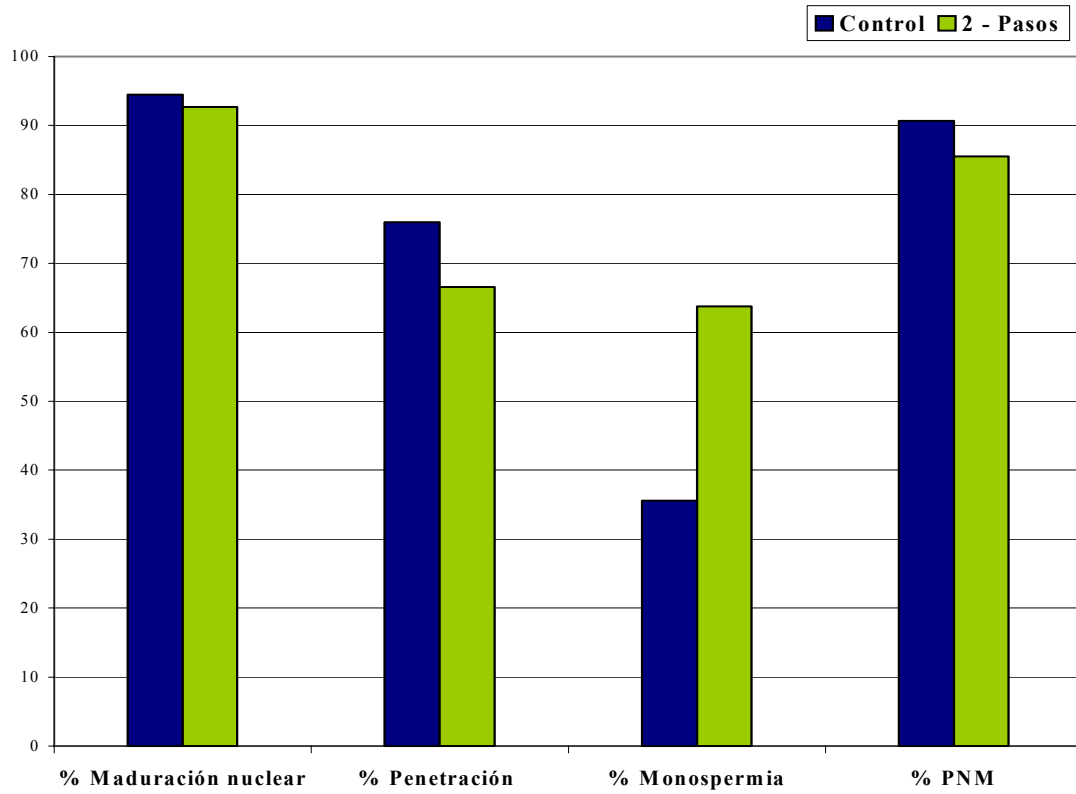


Tabla 14. Media y error estándar de la media para los distintos parámetros espermáticos del semen empleado en la experiencia 3, en 6 replicados.

Parámetros espermáticos	Semen fresco	Semen refrigerado	Semen diluido en TBMm
Volumen de la fracción rica del eyaculado (mL)	66,8±17,4		
Concentración espermática (10 ⁷ spz/mL)	103,4±19,4		
Espermatozoides móviles (%)	84±4,8	82±6,4	72,5±3,8
Calidad movimiento (0-5)	4±0	3±0	5±0
Aglutinación (0-2)	1±0		
Morfoanomalías (%)	5,8±3		
Acrosomas normales (%)	96,6±2,6	95±2,5	
Espermatozoides funcionales (%)			75,3±2,6

En la tabla 14 se muestran los resultados de los diferentes parámetros espermáticos analizados en el semen eyaculado recién recogido (semen fresco), en el semen diluido en medio de conservación y mantenido a 15°C durante 24 horas (semen refrigerado) y en el semen diluido en el medio de fecundación TBMm e incubado durante 5-10 minutos en condiciones de 39°C de temperatura y 5% de CO₂ en atmósfera saturada de humedad (semen diluido en TBMm). Los resultados obtenidos permitieron considerar como válido para su utilización en la fecundación *in vitro* al semen empleado para cada uno de los 6 replicados.

4.4. EFECTO DE LA COMPLEMENTACIÓN DEL MEDIO DE CE CON AMINOÁCIDOS Y DE LA RELACIÓN DE EMBRIONES/VOLUMEN DE MEDIO SOBRE LA DIVISIÓN Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO*

En general, el desarrollo embrionario se mejoró al enriquecer el medio de cultivo con aminoácidos, sin observarse grandes diferencias al reducir el volumen cultivo de 500 μL a microgotas de 50 μL .

Las tasas de división a las 48 h alcanzadas con el medio NCSU23 fueron de 56,4% en 500 μL vs 57,8% en 50 μL , mientras que con el suplemento de aminoácidos la división ascendió a 74,3% en 500 μL vs 68,2% en 50 μL . Las diferencias sólo fueron significativas entre la adición o no de aminoácidos ($P < 0,005$), pero no entre diferentes volúmenes dentro del mismo medio de cultivo. Sin embargo sí se pudo apreciar una tendencia a la significación ($P = 0,097$) a favor de la combinación NCSU23aa-500 frente a la de NCSU23aa-50.

El desarrollo hasta el estadio de mórula respecto al total fue superior significativamente en el medio NCSU23aa (51,2% en 500 μL y 55,8% en 50 μL) frente al mismo medio sin suplementación (32,7% en 500 μL y 42,3% en 50 μL). En el caso del medio NCSU23 sí se observó una mejoría significativa ($P = 0,013$) al reducir el volumen de cultivo a 50 μL .

Al valorar el porcentaje de mórulas respecto a los embriones divididos, el desarrollo fue significativamente más elevado al cultivar en microgota de 50 μL para los dos medios: en el medio NCSU23 (57,5% en 500 μL vs 75,5% en 50 μL ; $P = 0,0002$) y en el medio NCSU23aa (69,2% en 500 μL vs 82,7% en 50 μL ; $P = 0,001$). En el caso del cultivo en 500 μL , la adición de aminoácidos también mejoró significativamente ($P = 0,007$) el desarrollo a mórulas, aunque no hubo diferencias al cultivar en microgota de 50 μL con o sin aminoácidos.

Los resultados de porcentaje de blastocisto respecto al total de presuntos cigotos se comportaron del mismo modo que los de división, observándose una mejoría significativa ($P<0,01$) al enriquecer el medio con aminoácidos: 27,6% en 500 μL y 28,9% en 50 μL , comparado con la no suplementación: 15,4% en 500 μL y 19,5% en 50 μL . Asimismo, no hubo diferencias significativas dentro de cada medio al comparar diferentes volúmenes de cultivo.

El porcentaje de blastocistos respecto a los embriones divididos sólo fue significativamente diferente entre la adición o no de aminoácidos (37,2% en NCSU23aa vs 26,9% en NCSU23) en el cultivo en 500 μL ; y hubo una tendencia a la significación ($P=0,095$) en los cultivados en medio NCSU23 según el volumen de cultivo (26,9% en 500 μL vs 35,7% en 50 μL). En cambio, no hubo diferencias en el porcentaje de mórulas que se desarrollaron a blastocisto, ni entre los dos medios de cultivo ni entre los dos volúmenes de medio.

Tabla 15. Media y error estándar de la media para los distintos parámetros de desarrollo embrionario de los posibles cigotos cultivados en los dos tipos de medio de CE y los dos volúmenes diferentes de cultivo, en 8 replicados.

Medio CE -Volumen	n	% División (n)	% Mórulas (n)	% Mórulas (divididos)	% Blastocisto (n)	% Blastocisto (divididos)	% Blastocisto (mórulas)
NCSU23 -500	355	56,4 ± 2,6 ^a	32,7 ± 2,7 ^a	57,5 ± 3,3 ^a	15,4 ± 2,3 ^a	26,9 ± 3,7 ^{a+}	48,2 ± 5,4 ^a
NCSU23 -50	336	57,8 ± 2,6 ^a	42,3 ± 2,8 ^b	75,5 ± 3,4 ^{bc}	19,5 ± 2,4 ^a	35,7 ± 3,8 ^{a+b}	47,9 ± 4,7 ^a
NCSU23aa -500	353	74,3 ± 2,6 ^{b*}	51,2 ± 2,7 ^c	69,2 ± 2,8 ^b	27,6 ± 2,4 ^b	37,2 ± 3,1 ^b	54,4 ± 4,0 ^a
NCSU23aa -50	332	68,2 ± 2,6 ^{b*}	55,8 ± 2,8 ^c	82,7 ± 3,0 ^c	28,9 ± 2,4 ^b	43,1 ± 3,3 ^b	52,3 ± 3,9 ^a

NCSU23 – 500: Medio NCSU23 y 500 µL de volumen

NCSU23 – 50: Medio NCSU23 y microgota de 50 µL

NCSU23aa – 500: Medio NCSU23 con aminoácidos y 500 µL de volumen

NCSU23aa – 50: Medio NCSU23 con aminoácidos y microgota de 50 µL

n: número de presuntos cigotos puestos a cultivar

a, b, c: superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

*: tendencia a la significación ($P = 0,098$)

+: tendencia a la significación ($P = 0,095$)

Figura 33. Efecto de la complementación del medio de CE con aminoácidos y de la relación de embriones/volumen de medio sobre la división y el desarrollo embrionario *in vitro*

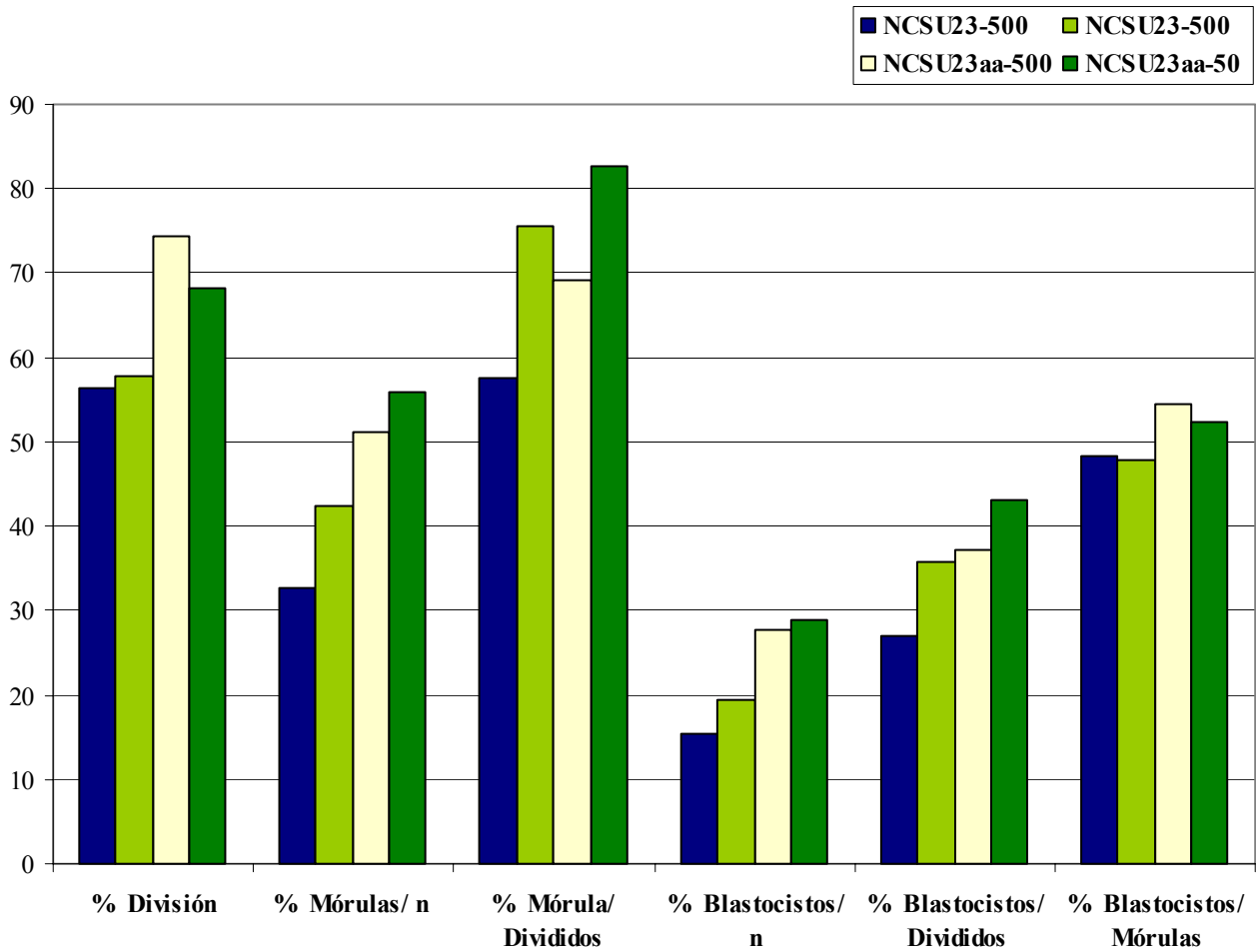


Tabla 16. Media y error estándar de la media para los distintos parámetros espermáticos del semen empleado en la experiencia 4, en 8 replicados

Parámetros espermáticos	Semen fresco	Semen refrigerado	Semen diluido en TBMm
Volumen de la fracción rica del eyaculado (mL)	56,1±9,6		
Concentración espermática (10 ⁷ spz/mL)	102,7±16,3		
Espermatozoides móviles (%)	78,8±2,2	76,3±6,3	76,9±5,2
Calidad movimiento (0-5)	3,9±0,2	3±0	5,0±0
Aglutinación (0-2)	0,8±0,4		
Morfoanomalías (%)	3,9±1,8		
Acrosomas normales (%)	94,8±2,1	94,5±2,2	
Espermatozoides funcionales (%)			78,8±4,2

En la tabla 16 se muestran los resultados de los diferentes parámetros espermáticos analizados en el semen eyaculado recién recogido (semen fresco), en el semen diluido en medio de conservación y mantenido a 15°C durante 24 horas (semen refrigerado) y en el semen diluido en el medio de fecundación TBMm e incubado durante 5-10 minutos en condiciones de 39°C de temperatura y 5% de CO₂ en atmósfera saturada de humedad (semen diluido en TBMm). Los resultados obtenidos permitieron considerar como válido para su utilización en la fecundación *in vitro* al semen empleado para cada uno de los 8 replicados.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El efecto positivo de la adición al medio de MIV del factor de crecimiento epidérmico (EGF) o de fragmentos de pared folicular (FPF) sobre la maduración nuclear, la maduración citoplasmática y el posterior desarrollo hasta blastocisto tras la FIV de ovocitos porcinos ha quedado demostrado en numerosos trabajos (Ding y Foxcroft, 1994b; Abeydeera *et al.*, 1998b, 1998c, 1999b; Liu *et al.*, 1997). Ding y Foxcroft (1994b) comprobaron un efecto beneficioso sobre la formación de PNM en ovocitos porcinos al enriquecer el medio de MIV con EGF y/o FPF, en presencia de gonadotropinas. Sin embargo, este estudio comparativo entre el EGF y los FPF (Ding y Foxcroft, 1994b) sólo se realizó sobre la maduración y penetración del ovocito, sin evaluarse la capacidad de desarrollo embrionario posterior.

En nuestro estudio, no observamos diferencias significativas entre los tres tratamientos (control, FPF o EGF) en la maduración nuclear, la penetración, el número de espermatozoides por ovocito penetrado (E/O), o la división embrionaria a las 48 h, al igual que ocurrió en los trabajos anteriormente citados (Ding y Foxcroft, 1994b; Abeydeera *et al.*, 1998b, 1998c, 1999b).

En cambio, la maduración citoplasmática, evaluada según el porcentaje de formación de PNM en los ovocitos penetrados, fue significativamente superior en los ovocitos tratados con EGF (93,6%) o con FPF (88%) respecto a los controles (73,6%). En los trabajos realizados por Abeydeera *et al.* en los que se estudió el efecto de la adición de 10 ng/mL de EGF (1998c) o de 6 FPF (1998b) al medio de maduración, en condiciones muy similares a las de nuestro estudio excepto por el uso de semen congelado en vez de refrigerado, no se encontraron diferencias en la formación de PNM entre el control y cada uno de los tratamientos. Estos autores (Abeydeera *et al.*, 1999b) tampoco observaron diferencias en la tasa de formación de PNM al madurar ovocitos porcinos en medio TCM199 libre de proteínas con 0,1% de PVA en ausencia de EGF o enriquecido con 10 ng/mL de EGF, o en medio NCSU23 con PPF y 10 ng/mL de EGF. En cambio, en un estudio similar realizado por Wang y Niwa (1995), sí se incrementó la formación de PNM

al añadir 1-100 ng/mL de EGF al medio TCM199 libre de proteínas con 0,1% de PVA, respecto a la no adición.

No obstante, al comparar la concentración intracelular de glutatión (GSH) entre los ovocitos madurados con o sin adición de FPF (Abeydeera *et al.*, 1998b), y con o sin adición de EGF (Abeydeera *et al.*, 1999b), sí se encontró una mejora significativa con el suplemento en ambos casos; lo que demuestra una mejora en la maduración citoplasmática tanto con FPF como con EGF que, en algunos casos, no se apreció con el parámetro de formación de PNM.

Respecto al porcentaje de monospermia, en tres de los trabajos anteriormente citados (Abeydeera *et al.*, 1998b, 1998c, 1999b) no se apreció una mejoría con la adición bien de EGF o de FPF. En nuestro caso, sólo observamos diferencias significativas en el porcentaje de monospermia entre los ovocitos madurados en medio control (52,6%) y los madurados en medio enriquecido con EGF (67,2%). En nuestra opinión, la reducción de la poliespermia que hemos logrado en presencia de EGF podría deberse al efecto estimulador del EGF sobre la producción y retención de ácido hialurónico dentro de la matriz extracelular de los cúmulos expandidos (Prochazka *et al.*, 2000). Se sabe que la adición de ácido hialurónico durante la preincubación espermática o el cocultivo de los espermatozoides con los ovocitos tiene un efecto positivo sobre la tasa de monospermia (Suzuki *et al.*, 2000), que puede deberse a la capacidad del ácido hialurónico de estimular la capacitación espermática sin inducir la reacción acrosómica espontánea (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1997, 1998a).

Aunque en nuestro sistema de fecundación los ovocitos son desnudos antes de ser expuestos a los espermatozoides, el ácido hialurónico se inserta en la región esponjosa más externa de la ZP, pudiéndose considerar parte de la ZP (Talbot y DiCarantonio, 1984). Por lo tanto, el mayor contenido en ácido hialurónico de la región exterior de la ZP de los ovocitos tratados con EGF podría actuar sobre los espermatozoides una vez llegan a las proximidades del ovocito, estimulando la capacitación espermática sin inducir la reacción acrosómica espontánea. El que en otros trabajos (Abeydeera *et al.*, 1998c, 1999b) no se haya encontrado un efecto beneficioso del EGF sobre la monospermia podría deberse a diferencias en los protocolos empleados en cada caso.

En cuanto al desarrollo embrionario hasta el estadio de mórula y de blastocisto, sólo encontramos diferencias significativas entre el medio control y el enriquecido con EGF (22,4% vs 31,4%, en el porcentaje de mórulas; y 1% vs 4,3% en el de blastocistos); sin mostrar el tratamiento con FPF diferencias con ninguno de los otros dos, ni en el porcentaje de mórulas (25,8%) ni en el de blastocistos (2,7%).

Estos resultados estarían en concordancia, en el caso del EGF, con los de otros autores (Abeydeera *et al.*, 1998c, 1999b), que también obtuvieron mejoras en el desarrollo a blastocisto con la adición; pero no con los trabajos en los que se estudió la adición de FPF (Abeydeera *et al.*, 1998b), pues en ellos también se logró una mejora en la tasa de blastocisto que nosotros no hemos comprobado. De todos modos, en ningún caso se hizo un estudio comparativo de la adición de EGF o FPF al medio de MIV sobre el desarrollo embrionario. Por otra parte, nuestros resultados de desarrollo a blastocisto (1%-4,3%) fueron excesivamente bajos, independientemente del tratamiento, por lo que no son comparables con los de los trabajos citados, en donde el porcentaje de blastocistos en los controles osciló de 18% a 22% y en los tratados de 36% a 42%.

Los resultados de la segunda experiencia nos demuestran que la combinación del medio de fecundación TBMm con una concentración espermática de 1×10^6 spz/mL (TBM-1) es con la que se consigue, en nuestras condiciones de trabajo, el mejor equilibrio entre una tasa aceptable de penetración (77,7%) y de monospermia (45,6%). Con la concentración de $0,5 \times 10^6$ spz/mL en medio TBMm (TBM-0,5), la tasa de monospermia (54,6%) fue mayor que con 1×10^6 spz/mL, presentando una tendencia a la significación ($P=0,064$); pero nos decantamos por la combinación TBM-1, pues con ella la penetración fue significativamente más elevada que con la TBM-0,5 (77,7% vs 52,9%; $P<0,0001$). En el caso del medio TALPm, independientemente de la concentración de semen, las tasas de penetración fueron muy elevadas (90,7-98,8%) y se acompañaron de una monospermia excesivamente baja (11,7-15,3%).

Centrándonos en el efecto de la concentración espermática, al aumentar la concentración de $0,5 \times 10^6$ a 1×10^6 espermatozoides/mL se produjo un incremento en todos los parámetros de fecundación evaluados: porcentaje de penetración y de poliespermia, y

número medio de espermatozoides por ovocito penetrado (E/O), independientemente del medio de fecundación empleado.

En la microgota de fecundación se introduce siempre el mismo número de ovocitos, por lo que a mayor concentración espermática, van a estar presentes un número más alto de espermatozoides por ovocito durante la FIV. Según Rath (1992), existe una elevada correlación entre el número absoluto de espermatozoides por ovocito durante la fecundación y la incidencia de poliespermia. Asimismo, al incrementarse el número total de espermatozoides por microgota, también lo hará el número de espermatozoides que se capacitan y/o que sufren reacciones acrosómicas espontáneas durante el cocultivo con los ovocitos que, como hemos visto, va a elevar la tasa de penetración así como la entrada simultánea de más de un espermatozoide en el ovocito antes de que éste establezca un bloqueo eficaz de la poliespermia (Abeydeera *et al.*, 1997; Funahashi y Nagai, 2001).

Con relación al medio de fecundación empleado, obtuvimos resultados muy dispares en los parámetros de fecundación al comparar los dos medios estudiados. Con el medio TALPm, la tasa de penetración fue superior al 90% y cada ovocito fue penetrado por una media de 7-8 espermatozoides, mientras que el porcentaje de penetraciones monospermicas fue menor del 16%. Todo lo contrario ocurrió en el caso del medio TBMm, con el que tanto las tasas de penetración (52,9 % y 77,7%) como de monospermia (54,6% y 45,6%) se mantuvieron en unos niveles intermedios, siendo bajo el número de espermatozoides por ovocito (1,7 y 2,1).

Las diferencias en la composición de cada uno de los medios (TALPm y TBMm) pueden explicar los resultados obtenidos. El medio de fecundación constituye el ambiente en el que los espermatozoides se van a capacitar, y en el que va a tener lugar la penetración y el bloqueo de la poliespermia. Tanto los espermatozoides como los ovocitos van a responder de diferente manera según sea la composición del medio en el que se encuentren.

Tabla 17. Diferencias en la composición entre el medio TBMm y el TALPm

Componentes	TBMm (mM)	TALPm (mM)
NaCl	113,1	114,1
KCl	3	3,2
CaCl ₂ .2H ₂ O	7,5	0
Lactato cálcico	0	8
Tris	20	0
NaHCO ₃	0	25,1
MgCl ₂ .6H ₂ O	0	0,5
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0	0,3
Lactato sódico	0	10
Glucosa	11	5
Piruvato sódico	5	1,1
Cafeína	1	2
BSA	1mg/mL	3mg/mL
PVA	0	1mg/mL
Gentamicina	0,05mg/mL	0
Kanamicina	0	0,01mg/mL
Rojo fenol	0,003	0,003

Tabla 18. Diferencias en los iones entre el medio TBMm y el TALPm

Iones	TBMm (mM)	TALPm (mM)
HCO ₃ ⁻	0	25,1
Ca ²⁺	7,5	8
Na ⁺	118,1	150,6
K ⁺	3	3,2
Cl ⁻	131,1	118,2
Mg ²⁺	0	0,5
H ₂ PO ₄ ⁻	0	0,3
Lactato (C ₃ H ₅ O ₃ ⁻)	0	26
Piruvato (C ₃ H ₃ O ₃ ⁻)	5	1,1

En las tablas 17 y 18 se pueden apreciar las diferencias en la composición de los dos medios. Vamos a analizarlas, deteniéndonos en aquellas sustancias que van a estimular la capacitación espermática y/o la reacción acrosómica espontánea, pues van a ser las principales responsables del incremento observado en la tasa de penetración, de poliespermia y en el número de espermatozoides por ovocito penetrado en el medio TALPm frente al TBMm.

En primer lugar, el TALPm es un medio tamponado con bicarbonato, mientras que el TBMm utiliza Tris como agente tampón del pH. Además de su función reguladora del pH del medio, el bicarbonato promueve la movilidad, capacitación y reacción acrosómica espontánea de los espermatozoides porcinos (Abeydeera *et al.*, 1997) al causar pérdida de materiales presentes en la superficie de los espermatozoides y estimular la fosforilación de proteínas espermáticas y la producción de AMPc. Aunque el medio TBMm no presenta bicarbonato en su composición original, no se puede descartar una cierta producción de iones HCO_3^- en este medio durante la incubación en condiciones de 5% de CO_2 y atmósfera saturada de humedad. De cualquier modo, la cantidad de HCO_3^- en la microgota de fecundación con TBMm va a ser inferior a la presente en el medio TALPm, en cuya composición inicial hay una concentración de 25,1 mM de bicarbonato. Según Abeydeera *et al.* (1997), el aumento de la concentración de bicarbonato sódico (NaHCO_3) en el medio de fecundación provoca un incremento en la movilidad, capacitación y reacción acrosómica espontánea de los espermatozoides.

El medio TBMm utiliza el cloruro cálcico ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) como fuente de calcio, mientras que el TALPm emplea el lactato cálcico, aunque la concentración de iones Ca^{2+} presentes en los dos medios es muy similar (7,5mM vs 8mM). Sin embargo, como el bicarbonato estimula e incrementa el flujo temprano de calcio hacia el citoplasma de los espermatozoides porcinos (Harrison *et al.*, 1993) y estos medios tienen diferente cantidad de HCO_3^- , es de esperar que el calcio no se comporte del mismo modo en cada medio. En el medio TALPm, con mayor concentración de bicarbonato, se podría producir una entrada más temprana de este ión en el espermatozoide, que aceleraría el inicio del proceso de capacitación, comparado con los espermatozoides incubados en TBMm; pues cuando la concentración de Ca^{2+} intracelular alcanza cierto nivel puede ser suficiente para disparar la reacción acrosómica espontánea (Yanagimachi, 1994).

El ión sodio (Na^+) también es más abundante en el medio TALPm (150,6mM en TALPm vs 118,1mM en TBMm). Los espermatozoides de ratón requieren una concentración de Na^+ superior a 125mM para que se produzca la capacitación y reacción acrosómica (Fraser *et al.*, 1993). Aunque no hay estudios similares en el cerdo, en el trabajo que hemos comentado anteriormente (Abeydeera *et al.*, 1997), el aumento de la concentración de bicarbonato sódico en el medio de fecundación incrementó la tasa de capacitación y reacción acrosómica espontánea en los espermatozoides. En este trabajo, además de elevarse la concentración de HCO_3^- , el nivel de Na^+ aumentó de 116mM a 146mM, por lo que no se pudo precisar qué parte del efecto estimulador correspondió al bicarbonato y qué parte al sodio.

Respecto a los suplementos macromoleculares, el medio TALPm contiene BSA a una concentración mayor que el TBMm (3 mg/mL vs 1 mg/mL), además de 1 mg/mL de PVA que no presenta el TBMm. En un estudio en el que se evaluó la adición de 1 ó 4 mg/mL de BSA en el medio de fecundación TBM, aunque no se observaron diferencias en la penetración ni en la poliespermia, el E/O fue mucho mayor al aumentar la concentración de BSA (7,2 vs 3,8) (Abeydeera y Day, 1997b). Estos resultados coinciden con los que obtuvimos nosotros respecto al parámetro E/O (6,9-7,9 con TALPm vs 1,7-2,1 con TBMm), y sugieren un efecto de la BSA sobre la capacitación de los espermatozoides de verraco, como ha quedado demostrado en el ratón (Fraser, 1985; Ward y Storey, 1984).

Los medios empleados en la FIV porcina se suelen complementar con cafeína, que estimula la movilidad, capacitación y penetración espermática en los espermatozoides de verraco (Wang *et al.*, 1991). El problema es que la cafeína estimula también la reacción acrosómica espontánea en los espermatozoides y, por tanto, la entrada simultánea en el ovocito de más de un espermatozoide, como se ha demostrado recientemente (Funahashi y Nagai, 2001). En nuestro estudio, las diferencias en la concentración de cafeína entre los dos medios no son muy altas (2mM en TALPm vs 1mM en TBMm), y no sabemos en qué grado habrán podido influir en los resultados obtenidos. Aún así, el medio con más cafeína, el TALPm, es en el que más alta ha sido la penetración, poliespermia y E/O.

Además de las diferencias que hemos descrito en detalle por considerar que explicaban mejor los resultados de penetración, monospermia y E/O obtenidos con cada

medio, existen otras que enumeramos a continuación: el pH (7,4 en TALPm vs 7,2-7,3 en TBMm), la concentración de los iones Cl^- , Mg^{2+} , H_2PO_4^- , lactato y piruvato (tabla 18), la concentración de glucosa (tabla 17), y el empleo de dos antibióticos diferentes (gentamicina en TBMm vs kanamicina en TALPm).

En un reciente trabajo, muy similar al nuestro, se estudió el efecto de los mismos medios de FIV (TALPm y TBMm) y de dos concentraciones espermáticas (4×10^5 y 4×10^6 espermatozoides/mL). Los resultados obtenidos coincidieron con los nuestros, ya que la tasa de penetración y de poliespermia se incrementó tanto al emplear la concentración espermática más alta, como con el medio TALPm comparado con el TBMm (Kidson *et al.*, 2001). El 28% de desarrollo a blastocisto obtenido con la combinación de medio TBMm y concentración de espermática 4×10^5 spz/mL, confirmó la ventaja del empleo del medio TBMm.

Los resultados de los parámetros espermáticos evaluados en el semen diluido en cada uno de los medios de fecundación no fueron muy diferentes: siendo el porcentaje de células móviles de 73,8% con el medio TBMm vs 78,2% con TALPm; la calidad de movimiento de 4,8 con TBMm vs 4,7 con TALPm; y el porcentaje de espermatozoides vivos de 77% con TBMm vs de 77,8% con TALPm.

Gruppen y Nottle (2000) describieron, en un reciente trabajo, una modificación del método de cocultivo de los ovocitos con los espermatozoides con la que lograron una sorprendente mejora en el porcentaje de penetración (80% vs 57%), de E/O (2,8 vs 4,4) y en el desarrollo embrionario a blastocisto (30% vs 8%), sin verse afectada la tasa de poliespermia (54% vs 41%). La modificación del sistema de cocultivo, denominada método en dos pasos, consistía en un cocultivo de 10 minutos de los ovocitos con la concentración total de espermatozoides, seguido del paso de los ovocitos con los espermatozoides adheridos a su ZP a una microgota de medio de fecundación libre de espermatozoides, donde se incubaron durante el mismo tiempo que los controles (5 horas en su caso).

A la vista de estos resultados, planteamos el siguiente experimento, con el fin de corroborar la mejora obtenida en los parámetros de FIV, utilizando nuestro sistema de producción *in vitro*. Los resultados que obtuvimos no coincidieron con los de este trabajo,

pues todos los parámetros evaluados relativos a la fecundación (penetración, poliespermia y E/O) fueron más altos con el método convencional, en el cual los ovocitos se mantuvieron con la concentración total de espermatozoides a lo largo de todo el cocultivo.

Si los ovocitos están expuestos a un número total de espermatozoides mayor durante un mismo tiempo, por tanto también a un mayor número de espermatozoides capacitados, es de esperar un porcentaje de penetración, de poliespermia y un E/O más alto (Abeydeera *et al.*, 1997; Funahashi y Nagai, 2001). Por lo tanto, nuestros resultados concordarían mejor con lo expuesto por estos autores, que los obtenidos por Grupen y Nottle.

La explicación a estos datos tan contradictorios podría encontrarse en las diferencias entre los protocolos de FIV empleados por cada equipo, principalmente el medio de fecundación y la concentración espermática. En relación al medio de fecundación, estos autores utilizaron el TALPm y nosotros el TBMm. Como acabamos de exponer al discutir el experimento anterior, el medio TALPm parece ser que estimula la capacitación y la reacción acrosómica espontánea de los espermatozoides en mayor grado y más tempranamente que el TBMm. Si pensamos que los ovocitos sólo se incuban durante 10 minutos con la concentración total de semen, cabría pensar que ese tiempo es suficiente en el caso del TALPm para capacitar a un elevado número de espermatozoides, pudiéndose éstos adherir a la ZP de los ovocitos antes de ser cambiados de gota. De este modo podríamos explicar unas tasas de penetración semejantes entre el método convencional y el modificado, pero no superiores. En nuestro trabajo, con el método en dos pasos se alcanzó una tasa de penetración algo inferior que con el convencional (66,6% vs 76%), pero a cambio el porcentaje de penetraciones poliespérmicas experimentó un descenso importante (36,2% vs 64,4%) así como el E/O (1,7 vs 2,8).

Por otra parte, la concentración espermática utilizada por estos autores fue 10-20 veces inferior a la nuestra ($0,5-1 \times 10^5$ vs 1×10^6 spz/mL). Esta menor concentración espermática explicaría, en el caso del método convencional, las diferencias obtenidas en el porcentaje de penetración y de poliespermia, aunque no las del número de espermatozoides por ovocito penetrado (E/O).

De todos modos, podemos concluir diciendo que logramos el objetivo de reducir la poliespermia, sin que se viese muy afectada la tasa de penetración. Además, con este método nuevo de cocultivo se evita que los ovocitos estén expuestos durante las 4 horas de incubación a los altos niveles de especies reactivas del oxígeno generadas por los espermatozoides muertos o dañados en la microgota que, provocarían daños oxidativos en el ovocito, reduciendo su posterior potencial de desarrollo embrionario.

En la última experiencia de este trabajo, analizamos el efecto del cultivo de los embriones en distintos volúmenes de medio y/o de la adición de aminoácidos esenciales y no esenciales al medio de cultivo sobre el desarrollo embrionario.

La reducción del volumen de cultivo de 500 a 50 microlitros correspondió con una disminución en la relación volumen/embriones de 10 a 1 microlitro por embrión. Para cada medio de cultivo evaluado, NCSU23 y NCSU23aa, no obtuvimos diferencias significativas ni en la división embrionaria a las 48 horas, ni en el porcentaje de blastocistos sobre el total de embriones cultivados (% blastocistos/n), sobre los divididos (% blastocistos/divididos) o sobre las mórulas (% blastocistos/mórulas). Es decir, que las primeras fases de división, así como la diferenciación embrionaria a blastocisto no se vieron afectadas al reducir el volumen de medio por embrión. Por el contrario, el porcentaje de mórulas sobre el total de embriones en cultivo en el caso del medio NCSU23 (42,3 % en 50 μ L vs 32,7% en 500 μ L) y de embriones divididos a las 48 horas que se desarrollaron a mórula (% mórulas/divididos) en los dos medios (75,5 % en NCSU23-50 vs 57,5 % en NCSU23-500; y 82,7 % en NCSU23aa-50 vs 69,2 % en NCSU23aa-500) sí fue significativamente superior al reducir el volumen de cultivo.

Estos resultados estarían más en concordancia con la hipótesis de la producción de factores autocrinos y/o paracrinos por parte del embrión en cultivo (Paria y Dey, 1990; O'Neill, 1998), beneficiosos para el desarrollo del propio embrión que los genera y el de los embriones vecinos y que, al encontrarse en un volumen pequeño, alcanzarían una concentración suficiente para ejercer su efecto (Gardner, 1994). En nuestro caso, el efecto de estos factores de crecimiento y/o de supervivencia producidos por los embriones sólo se detectó en las últimas etapas de división embrionaria previas a la diferenciación hacia

blastocisto, estimulando principalmente el paso de los embriones divididos hasta el estadio de mórulas, y no sobre la división embrionaria o el desarrollo a blastocisto.

El hecho de no haberse encontrado diferencias en el porcentaje de mórulas que evolucionaron hasta blastocisto (47,9 % en NCSU23-50 vs 48,2 % en NCSU23-500; y 52,3% en NCSU23aa-50 vs 54,4% en NCSU23aa-500), no significa que los factores producidos por los embriones no estimulen la diferenciación embrionaria, sino que se pudo deber simplemente a las características de nuestro trabajo. En el sistema de cultivo embrionario que empleamos para este estudio, el cambio del medio de cultivo con BSA al enriquecido con FCS, tanto en el medio NCSU23 como en el NCSU23aa, se realizó tras 125 horas de cultivo, momento en el que los embriones se encontraban en estadio de mórula. Este cambio conllevó una renovación del medio y, por tanto, la pérdida de los factores estimulantes del desarrollo y diferenciación embrionaria que hubieran producido los embriones a lo largo del cultivo hasta el momento del cambio. Esta explicación vendría a corroborar la hipótesis de que la producción de sustancias estimulantes por parte del embrión es la responsable de la mejora en el desarrollo embrionario al reducir el volumen de cultivo por embrión, pues al eliminarlas tras la renovación del medio, desapareció su posible efecto.

Aunque tampoco debemos olvidar que la presencia de FCS durante la segunda fase de cultivo (desde las 125 h hasta las 168-192 h) podría enmascarar el estímulo de las sustancias producidas por los embriones durante estas últimas horas. Como hemos visto, el suero proporciona ciertos factores, como aminoácidos (Spindle, 1980) y factores de crecimiento (Schultz y Heyner, 1993), que pueden estimular la formación de blastocistos (Gardner *et al.*, 1994; Hochi *et al.*, 1994; Meyen *et al.*, 1989). La presencia de estos compuestos unido a las propiedades antioxidantes del suero (Kan y Yamane, 1983), que protegen al embrión frente a las especies reactivas del oxígeno producidas durante el cultivo, podría llegar a ocultar el efecto beneficioso del cultivo en un volumen reducido. Es probable que las dos explicaciones sean ciertas y actúen simultáneamente.

El efecto de la adición de aminoácidos al medio de cultivo sobre el desarrollo de los embriones porcinos ha sido abordado en varios trabajos (Dobrinsky *et al.*, 1996; Koo *et al.*,

1997; Long *et al.*, 1999) obteniéndose diferentes resultados según las condiciones del sistema de producción *in vitro* empleado.

Dobrinsky *et al.* (1996) compararon el cultivo *in vitro* de embriones de 1-2 células obtenidos *in vivo* en medio BECM-3 o NCSU-23, obteniendo un porcentaje de desarrollo a blastocisto del 69% en BECM-3 y de 49% en NCSU23, sin encontrar diferencias significativas. La composición de estos dos medios se diferencia por la presencia en el BECM-3 de aminoácidos esenciales y no esenciales, lactato sódico y piruvato sódico, y en el NCSU23 de BSA, taurina, hipotaurina y fosfato potásico. Sin embargo, al comparar estos mismos autores (Long *et al.*, 1999) el cultivo de embriones MIV/FIV en BECM-6 (BCEM-3 enriquecido con BSA), en BCEM-7 (BCEM-3 enriquecido con BSA, taurina e hipotaurina), NCSU23 y NCSU23aa (NCSU23 enriquecido con aminoácidos esenciales y no esenciales), el desarrollo a blastocisto fue superior en el NCSU23 y NCSU23aa frente al BCEM-6 y BCEM-7. Según estos resultados, vemos que el estímulo de los aminoácidos sobre la producción de blastocistos dependió del binomio origen de los embriones (obtenidos *in vivo* o producidos *in vitro*) y composición del medio de cultivo.

En nuestro caso, la división a las 48 horas, y el desarrollo a mórula y a blastocisto respecto al total de embriones en cultivo fue significativamente superior al añadir aminoácidos, independientemente del volumen de medio utilizado. Además, en el caso del cultivo en 500 μL , el porcentaje de mórulas y de blastocistos respecto a los divididos también se incrementó con el medio NCSU23aa; mientras que estos parámetros fueron iguales al cultivar en microgota de 50 μL , debido probablemente a que el efecto beneficioso del cultivo en microgota ocultase la acción de los aminoácidos.

Por lo tanto, en nuestras condiciones de trabajo, la adición de aminoácidos esenciales y no esenciales al medio NCSU23 mejoró notablemente tanto la división como el desarrollo embrionario preimplantacional a mórula y blastocisto.

Al igual que ocurrió al comparar los dos volúmenes de cultivo, no apreciamos diferencias significativas en el porcentaje de mórulas que alcanzaron el estadio de blastocisto con o sin adición de aminoácidos. Podría ser que la presencia de FCS en esa fase de desarrollo haya enmascarado o modificado el estímulo de los aminoácidos sobre la

diferenciación embrionaria. En un estudio realizado por Rosenkrans *et al.* (1989), el efecto de los aminoácidos dependió de la presencia o no de suero en el medio; siendo la glutamina beneficiosa en ausencia de suero y perjudicial en su presencia, mientras que en el caso de la fenilalanina, metionina e isoleucina ocurrió lo contrario.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La adición del factor de crecimiento epidérmico (EGF) o de fragmentos de pared folicular (FPF) al medio de maduración estimula la maduración citoplasmática de los ovocitos porcinos; pero sólo la complementación con EGF reduce la poliespermia e incrementa el desarrollo embrionario hasta el estadio de mórula y de blastocisto.
2. El medio de fecundación empleado influye en los parámetros de fecundación alcanzados; siendo los porcentajes de penetración, poliespermia y el número de espermatozoides por ovocito (E/O) muy elevados con el medio TALPm, mientras que con el medio TBMm la penetración y poliespermia se mantienen en unos valores intermedios, siendo bajo el E/O.
3. Asimismo, los parámetros de fecundación están influenciados por la concentración espermática utilizada, incrementando sus valores al aumentar la misma.
4. La combinación del medio de fecundación TBMm y de la concentración espermática de 1×10^6 espermatozoides/mL es con la que se obtiene un mejor equilibrio entre la penetración y la monospermia, alcanzando un porcentaje adecuado de ovocitos penetrados sin que se incrementen en exceso las penetraciones poliespérmicas.
5. Con el método de cocultivo de ovocitos y espermatozoides en dos pasos se logra un incremento notable en la tasa de monospermia, con una pequeña reducción en los valores de penetración.
6. La reducción del volumen de cultivo de los embriones estimula el desarrollo embrionario previo a la diferenciación, principalmente en el paso de los embriones divididos a mórulas.
7. La adición de aminoácidos esenciales y no esenciales al medio de cultivo de embriones incrementa la división y el desarrollo embrionario hasta mórula y blastocisto.

8. El conjunto de modificaciones introducidas en nuestro sistema inicial de producción *in vitro* de embriones mejora, de manera global, el rendimiento de la técnica; logrando aumentar la maduración citoplasmática de los ovocitos, reducir la poliespermia elevando, al mismo tiempo, el porcentaje de penetración, e incrementar ampliamente el desarrollo embrionario hasta blastocisto.

RESUMEN

7. RESUMEN

En los últimos años se han logrado progresos considerables en el desarrollo de los procedimientos de MIV, FIV y cultivo embrionario. Aunque los sistemas de producción *in vitro* disponibles son aptos para la generación de embriones porcinos, sigue sin resolverse el problema de la elevada poliespermia y de la baja capacidad de desarrollo de los embriones porcinos.

El presente trabajo se llevó a cabo con el objetivo de reducir la poliespermia e incrementar el desarrollo embrionario preimplantacional, mejorando de este modo el rendimiento de la técnica de producción *in vitro* establecida en nuestro laboratorio. Para alcanzar este objetivo, se incorporaron una serie de modificaciones a nuestro sistema de producción de embriones, abarcando todas las fases que constituyen la técnica: MIV, FIV y cultivo embrionario.

El medio de MIV fue modificado, complementándolo con EGF o FPF. La adición de EGF permitió mejorar la maduración citoplasmática de los ovocitos, la monospermia y el desarrollo embrionario. Posteriormente, se valoró la modificación de tres de los principales componentes del sistema de FIV: el medio de fecundación, la concentración espermática y el método de cocultivo de los ovocitos con los espermatozoides. La combinación de medio de fecundación TBMm y de concentración espermática de 1×10^6 espermatozoides/mL fue con la que se logró un mejor equilibrio entre el porcentaje de penetración y el de poliespermia. Además, la incorporación del método de cocultivo en dos pasos dió lugar a una notable reducción en la tasa de poliespermia. Finalmente, se evaluó la complementación del medio de cultivo de embriones con aminoácidos esenciales y no esenciales y la reducción del volumen de cultivo, lográndose con estas dos modificaciones incrementar en el desarrollo embrionario.

Gracias al conjunto de las modificaciones incorporadas a nuestro sistema inicial de producción *in vitro* de embriones se consiguió mejorar de manera global el rendimiento de la técnica. De este modo, la maduración citoplasmática, valorada como el porcentaje de formación de pronúcleo masculino, se vió incrementada de un 73,6% a un 93,6%; el

porcentaje inicial de penetración aumentó de un 53,2% a un 66,6%; la poliespermia se redujo de un 47,4% a un 36,2%; y el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto mejoró desde un porcentaje inicial del 1% hasta el 28,9%.

Los resultados obtenidos confirman que el limitado desarrollo hasta blastocisto de los embriones porcinos producidos *in vitro* no se debe a un fallo puntual en la técnica, sino a la combinación de una maduración citoplasmática inadecuada o incompleta, una elevada poliespermia, una formulación inadecuada de los medios de cultivos y unas condiciones de cultivo embrionario subóptimas. El incremento en el rendimiento final de la técnica que hemos alcanzado nos permitirá disponer de un mayor número de embriones así como de ovocitos maduros, para ser empleados en futuros estudios.

SUMMARY

8. SUMMARY

During the past years, considerable progress has been achieved on the development of the IVM, IVF and embryo culture procedures. Although the available *in vitro* production systems are suitable for the generation of swine embryos, the problem of the high polyspermy and the poor developmental competence of embryos are still unresolved.

The aim of the present study was to reduce the polyspermy and to increase the early embryo development, improving in this way the efficiency of the *in vitro* production technique established in our laboratory. To achieve this objective, a set of modifications were introduced to our embryo production system, involving all the phases that compose the technique: IVM, IVF and embryo culture.

The IVM medium was modified, with EGF or FPF (pieces of follicular wall) supplementation. The addition of EGF allowed improving the cytoplasmic maturation of the oocytes, the monospermy and the embryo development. Afterwards, it was analyzed the modification of three of the main components of the IVF system: the IVF medium, the sperm concentration and the method of co-culture of the oocytes and the spermatozoa. With the combination of the IVF medium TBMm and the sperm concentration of 1×10^6 spermatozoa/mL, a better balance between the percentage of penetration and the rate of polyspermy was reached. Furthermore, the inclusion of the co-culture method in two steps gave rise to an outstanding reduction in the percentage of polyspermy. Finally, it was evaluated the supplementation of the embryo culture medium with essential and non-essential amino acids and the reduction of the culture volume, allowing with these two modifications to improve the embryo development.

The set of modifications incorporated into our initial system of *in vitro* embryo production has permitted to achieve a global improvement in the efficiency of the technique. In this way, the cytoplasmic maturation, assessed as the percentage of male pronuclear formation, was increased from 73,6% to 93,6%; the initial penetration rate was risen from 53,2% to 66,6%; the polyspermy was reduced from 47,4% to 36,2%; and the

embryo development to the blastocyst stage was improved from a initial percentage of 1% to 28,9%.

The results obtained confirm that the limited embryo development to the blastocyst stage of the porcine *in vitro* produced embryos is not due to a unique failure in the technique, but to the combination of an inadequate or incomplete cytoplasmic maturation, a high polyspermy, an unsuitable formulation of the culture media and suboptimal embryo culture conditions. The increase on the final efficiency of the technique that we have reached will allow having a higher number of embryos and mature oocytes to be used in future studies.

ABREVIATURAS

9. ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMPc: adenosil monofosfato cíclico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BECM: medio de cultivo de embriones Beltsville (*Beltsville Embryo Culture Medium*)

BME: medio Eagle con aminoácidos esenciales (*Basal Medium Eagle Amino Acids*)

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

CE: cultivo *in vitro* de embriones

COC: complejo células del cumulus oophorus-ovocito. En plural COCs

CP: corpúsculo polar

DCF: diacetato de carboxifluoresceína

dbAMPc: dibutilil adenosín monofosfato cíclico

E/O: número medio de espermatozoides por ovocito penetrado

eCG: gonadotropina coriónica equina (*Equine Chorionic Gonadotropin*)

EGF: factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*)

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

FIV: fecundación *in vitro*

FO: fluido oviductal

FPF: fragmentos de pared folicular

FPP: péptido promotor de la fecundación (*Fertilization Promotor Peptide*)

FSH: hormona folículo estimulante

GAGs: glicosaminoglicanos

GC: gránulos corticales

GLM: General Linear Model

GSH: glutatión

hCG: gonadotropina coriónica humana (*Human Chorionic Gonadotropin*)

IA: inseminación artificial

IGF: factor de crecimiento similar a la insulina (*Insulin-like Growth Factor*)

IP: yoduro de propidio

KRB: medio Krebs Ringer Bicarbonato

- LH:** hormona luteinizante
- MAPK:** proteinkinasa MAP (*Mitogen-activated Protein Kinases*)
- MEM:** medio Eagle con amino ácidos no esenciales (*Minimum Essential Medium Eagle Non-essential Amino Acids*)
- MII:** estadio nuclear de metafase II
- MIV:** maduración *in vitro*
- MPF:** factor promotor de la maduración o de la metafase (*Metaphase Promotor Factor*)
- n:** número total
- NCSU23:** medio *North Carolina State University 23*
- p/v:** peso/volumen
- P:** probabilidad
- PBSm:** Tampón fosfato salino modificado (*Phosphate Buffered Saline*)
- PPF:** fluido folicular porcino (*Porcine Follicular Fluid*)
- PIV:** producción *in vitro* de embriones
- PNM:** pronúcleo masculino
- % PNM:** porcentaje de formación de pronúcleo masculino
- pOSP:** glicoproteína específica del oviducto porcino (*Porcine Oviductal Specific Protein*)
- PVA:** polivinilalcohol
- PVP:** polivinilpirrolidona
- RA:** reacción acrosómica
- SEM:** error estándar de la media (*Standard Error of the Mean*)
- spz/mL:** número de espermatozoides por mililitro (concentración espermática)
- TALPm:** medio de Tyrodes con albúmina, lactato y piruvato modificado (*Tyrodes Albumin Lactate Pyruvate*)
- TBMm:** medio tris tamponado modificado (*Tris Buffered Medium*)
- TCM199:** medio de cultivo 199 (*Tissue Culture Medium-199*)
- TIMP:** inhibidor tisular de las metaloproteinasas (*Tisular Inhibitor of Metalloproteinases*)
- UI:** unidades internacionales
- UUT:** unión útero tubárica
- v/v:** volumen/volumen
- VG:** vesícula germinal
- ZP:** zona pelúcida

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

10. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

10.1. ÍNDICE DE TABLAS

- *Tabla 1.* Composición del PBSm.....98
- *Tabla 2.* Composición del medio NCSU23 libre de BSA con 10% de PFF, 0,1 mg/mL de cisteína y 0,05 mg/mL de gentamicina.....99
- *Tabla 3.* Suplementos del medio NCSU23 libre de BSA con 10% de PFF, 0'1 mg/mL de cisteína y 0,05 mg/mL de gentamicina (MIV-control), según su utilización.....100
- *Tabla 4.* Composición del medio TBMM enriquecido con 1 mg/mL de BSA, 1 mM de cafeína y 0,05 mg/mL de gentamicina.....101
- *Tabla 5.* Composición del TALPm.....102
- *Tabla 6.* Composición del medio NCSU23 libre de BSA.....103
- *Tabla 7.* Suplementos del medio NCSU23 según su utilización.....103
- *Tabla 8.* Media y error estándar de la media para los distintos parámetros de maduración y fecundación de los ovocitos madurados con los tres tipos de medio de MIV, en 7 replicados.....134
- *Tabla 9.* Media y error estándar de la media para los distintos parámetros espermáticos del semen empleado en la experiencia 1, en 7 replicados.....135
- *Tabla 10.* Media y error estándar de la media para los distintos parámetros de desarrollo embrionario tras la FIV de los ovocitos madurados con los tres tipos de medio de MIV, en 6 replicados.....136

- *Tabla 11.* Media y error estándar de la media para los distintos parámetros de maduración y fecundación de los ovocitos fecundados con los dos tipos de medio de FIV y las dos concentraciones de espermatozoides, en 6 replicados.....139
- *Tabla 12.* Media y error estándar de la media para los distintos parámetros espermáticos del semen empleado en la experiencia 2, en 6 replicados.....141
- *Tabla 13.* Media y error estándar de la media para los distintos parámetros de maduración y fecundación de los ovocitos fecundados con los dos tipos de métodos de cocultivo espermatozoides-ovocitos, en 6 replicados.....142
- *Tabla 14.* Media y error estándar de la media para los distintos parámetros espermáticos del semen empleado en la experiencia 3, en 6 replicados.....144
- *Tabla 15.* Media y error estándar de la media para los distintos parámetros de desarrollo embrionario de los posibles cigotos cultivados en los dos tipos de medio de CE y los dos volúmenes diferentes de cultivo, en 8 replicados.....147
- *Tabla 16.* Media y error estándar de la media para los distintos parámetros espermáticos del semen empleado en la experiencia 4, en 8 replicados.....149
- *Tabla 17.* Diferencias en la composición entre el medio TBMm y el TALPm.....155
- *Tabla 18.* Diferencias en los iones entre el medio TBMm y el TALPm.....155

10.2. ÍNDICE DE FIGURAS

- *Figura 1.* 1.A: Ovario con desarrollo folicular adecuado. 1.B: Ovario con folículos grandes (diámetro>7 mm). 1.C: Ovario con folículos pequeños (diámetro<3mm). 1.D: Ovario con presencia de cuerpos lúteos.....122

- *Figura 2.* 2.A: Punción de folículos ováricos con bisturí. 2.B: Decantación de COCs diluidos en PBSm.....122

- *Figura 3.* Selección de COCs 3.1: Estereomicroscopio y sistema de manipulación de COCS, ovocitos y embriones. 3.2: Detalle de pipeta Pasteur preparada para la manipulación y placa de Petri.....123

- *Figura 4.* Morfología de los COCs porcinos. 4.1: Ovocito rodeado por más de tres capas de células del cúmulus y pedúnculo de unión a la pared folicular. 4.2: Ovocito rodeado por menos de tres capas de células del cúmulus. 4.3: Ovocito desnudo.....123

- *Figura 5.* COC porcino en el que se aprecia la expansión del cúmulus.....123

- *Figura 6.* Ovocito porcino en estadio de rotura de vesícula germinal. Tinción con Hoechst 33342. Microscopio de epifluorescencia, 400 aumentos.....124

- *Figura 7.* Ovocito porcino en estadio de metafase I. Tinción con Hoechst 33342. Microscopio de epifluorescencia, 400 aumentos.....124

- *Figura 8.* Ovocito porcino en estadio de metafase II. Tinción con Hoechst 33342. Microscopio de epifluorescencia, 400 aumentos.....124

- *Figura 9.* Ovocito porcino monospermico con dos pronúcleos y dos corpúsculos polares. Tinción con Hoechst 33342. Microscopio de epifluorescencia, 400 aumentos.....125

- *Figura 10.* Ovocito porcino poliespermico con tres pronúcleos y varias cabezas descondensadas. Tinción con Hoechst 33342. Microscopio de epifluorescencia, 400 aumentos.....125

- *Figura 11.* Ovocito porcino poliespermico con varios pronúcleos y cabezas descondensadas. Tinción con Hoechst 33342. Microscopio de epifluorescencia, 400 aumentos.....125

- *Figura 12.* Ovocito porcino con cabeza espermática descondensada. Tinción con Hoechst 33342. Microscopio de epifluorescencia, 600 aumentos.....126

- *Figura 13.* Espermatozoide porcino alterado emitiendo fluorescencia roja. Tinción con Diacetato de carboxifluoresceína-Ioduro de propidio. Microscopio de epifluorescencia, 600 aumentos.....126

- *Figura 14.* Tres espermatozoides porcinos funcionales emitiendo fluorescencia verde. Tinción con Diacetato de carboxifluoresceína-Ioduro de propidio. Microscopio de epifluorescencia, 600 aumentos.....126

- *Figura 15.* Grupo de embriones porcinos en diferentes estadios de desarrollo. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 100 aumentos.....127

- *Figura 16:* 16.A. Embriones porcinos de una célula. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 100 aumentos. 16.B. Embrión porcino de dos células. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 100 aumentos.....127

- *Figura 17.* Embrión porcino en estadio de mórula. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 200 aumentos.....128

- *Figura 18.* Embrión porcino en estadio de mórula compacta. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 200 aumentos.....128

- *Figura 19.* Embrión porcino en estadio de mórula compacta, a la izquierda; y embrión porcino iniciando la formación del blastocele, a la derecha. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 200 aumentos.....128

- *Figura 20.* Blastocisto porcino con pequeño blastocele. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 200 aumentos.....129

- *Figura 21.* Blastocisto porcino con blastocele de mayor tamaño. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 200 aumentos.....129

- *Figura 22.* Blastocisto porcino cuyo blastocele ocupa casi la totalidad del embrión, en la parte superior se aprecia la masa celular interna. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 200 aumentos.....129
- *Figura 23.* Blastocisto porcino expandido. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 200aumentos.....130
- *Figura 24.* Blastocisto porcino expandido. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 400aumentos.....130
- *Figura 25.* Blastocisto porcino expandido y colapsado, se aprecia un mayor espacio perivitelino. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 200aumentos.....130
- *Figura 26.* Blastocisto porcino eclosionando, en la parte inferior se aprecia la rotura de la zona pelúcida y la salida del embrión. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 400 aumentos.....131
- *Figura 27.* Blastocisto porcino totalmente eclosionado, desprovisto de la zona pelúcida. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 200 aumentos.....131
- *Figura 28.* Detalle de un blastocisto porcino eclosionado, se aprecian las células del trofoblasto. Microscopio invertido con óptica Hoffman, 400 aumentos.....131
- *Figura 29.* Efecto de la complementación del medio de MIV con EGF o con FPF sobre la maduración y la fecundación *in vitro*.....137
- *Figura 30:* Efecto de la complementación del medio de MIV con EGF o con FPF sobre el desarrollo embrionario *in vitro*.....137
- *Figura 31.* Efecto del medio de FIV y de la concentración espermática sobre la penetración y la poliespermia.....140

- *Figura 32.* Efecto del método de cocultivo de los ovocitos con los espermatozoides sobre la penetración y la poliespermia.....143

- *Figura 33.* Efecto de la complementación del medio de CE con aminoácidos y de la relación de embriones/volumen de medio sobre la división y el desarrollo embrionario *in vitro*.....148

BIBLIOGRAFÍA

11. BIBLIOGRAFÍA

Abeydeera, LR. *In vitro* fertilization and embryo development in the pig. *J Reprod Fertil* **2001**; 58 (Suppl): 159-173

Abeydeera, LR. *In vitro* production of embryos in swine. *Theriogenology* **2002**; 57: 257-273

Abeydeera, LR. y Day, BN. Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified Tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biol Reprod* **1997a**; 57: 729-734

Abeydeera, LR. y Day, BN. *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified Tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology* **1997b**; 48: 537-544

Abeydeera, LR.; Funahashi, H. Kim, NH. y Day, BN. Chlortetracycline fluorescence patterns and *in vitro* fertilization of frozen-thawed boar spermatozoa incubated under various bicarbonate concentrations. *Zygote* **1997**; 5: 117-125

Abeydeera, LR.; Wang, WH.; Cantley, TC.; Prather, RS. y Day, BN. 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* **1998a**; 50: 747-756

Abeydeera, LR.; Wang, WH.; Cantley, TC.; Rieke, A. y Day, BN. Coculture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after *in vitro* fertilization: relevance to intracellular glutathione. *Biol Reprod* **1998b**; 58: 213-218

Abeydeera, LR.; Wang, WH.; Cantley, TC.; Rieke, A.; Prather, RS. y Day, BN. 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* **1998c**; 51: 395-401

Abeydeera, LR.; Prather, RS. y Day, BN. Developmental ability of *in vitro*-derived pig embryos in four different media. *Biol Reprod* **1999a**; 60 (Suppl): 128 (Abstr)

Abeydeera, LR.; Wang, WH.; Cantley, TC.; Rieke, A.; Prather, RS. y Day, BN. Epidermal growth factor can enhance the developmental competence of pig oocytes matured *in vitro* under protein-free culture conditions. *Theriogenology* **1999b**; 51: 365 (Abstr)

Abeydeera, LR.; Wang, WH.; Prather, RS. y Day, BN. Effect of incubation temperature on *in vitro* maturation of porcine oocytes: nuclear maturation, fertilization and developmental competence. *Zygote* **2001**; 9: 331-337

Ahern, TJ. y Gardner, DK. Culturing bovine embryos in group stimulates blastocyst development and cell allocation to the inner cell mass. *Theriogenology* **1998**; 49: 194 (Abstr)

Ahkong, QF.; Fisher, D.; Tampion, W. y Lucy, JA. Mechanism of cellular fusion. *Nature* **1975**; 253: 194-195

Ainsworth, L.; Tsang, BK.; Downey, BR.; Marcus, GJ. y Armstrong, DT. Interrelationships between follicular fluid steroid levels, gonadotropic stimuli, and oocyte maturation during preovulatory development of porcine follicles. *Biol Reprod* **1980**; 23: 621-627

Aitken, RJ. A free radical theory of male infertility. *Reprod Fertil Dev* **1994**; 6: 19-24

Albertini, DF. y Anderson, E. The appearance and structure of intercellular connections during the ontogeny of the rabbit ovarian follicle with particular reference to gap junctions. *J Cell Biol* **1974**; 63: 234-250

Alvarez, JG. y Story, BT. Lipid peroxidation and the reactions of superoxide and hydrogen in mouse spermatozoa. *Biol Reprod* **1984**; 30: 833-841

Anbari, K. y Schultz, RM. Effect of sodium and betaine in culture media on development and relative rates of protein synthesis in preimplantation mouse embryos *in vitro*. *Mol Reprod Dev* **1993**; 35: 24-28

Archibong, AE.; Petters, RM. y Johnson, BH. Development of porcine embryos from one- and two-cell stages to blastocysts in culture medium supplemented with porcine oviductal fluid. *Biol Reprod* **1989**; 41: 1076-1083

Ashworth, PJC.; Harrison, RAP.; Miller, NGA.; Plummer, JM. y Watson, PF. Flow cytometric detection of bicarbonate-induced changes in lectin binding in boar and ram sperm populations. *Mol Reprod Dev* **1995**; 40: 164-176

Austin, CR. Capacitation and the release of hyaluronidase from spermatozoa. *J Reprod Fertil* **1960**; 3: 310-311

Austin, CR. *The Mammalian Egg*. Ed: Charles C. Thomas. Springfield, Illinois, **1961**

Avissar, N.; Whitin, JC.; Allen, PZ.; Wagner, DD.; Liegey, P. y Cohen, HJ. Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase: cell origin and secretion. *J Biol Chem* **1989**; 264: 15850-15855

Babalola, GO. y Schultz, RM. Modulation of gene expression in the preimplantation mouse embryo by TGF- α and TGF- β . *Mol Reprod Dev* **1995**; 41: 133-139

Bannai, S. y Ishii, T. A novel function of glutamine in cell culture: utilization of glutamine for the uptake of cystine in human fibroblasts. *J Cell Physiol* **1988**; 137: 360-366

- Barends, PMG.; Stroband, HWJ.; Taverne, N.; Kronnie, G.; Leën, MPJM. y Blommers, OPCJ.** Integrity of the preimplantation pig blastocyst during expansion and loss of polar trophoblast (Rauber cells) and the morphology of the embryoblast as an indicator for developmental stage. *J Reprod Fertil* **1989**; 87: 715-726
- Barrat, CLR. y Cooke, ID.** Sperm transport in the human female reproductive tract—a dynamic interaction. *Int J Androl* **1991**; 14: 394-411
- Bavister, BD.** Substitution of a synthetic polymer for protein in a mammalian gamete culture system. *J Exp Zool* **1981**; 217: 45-51
- Bavister, BD.** Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology* **1988**; 29: 143-154
- Bavister, BD.** Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reprod Update* **1995**; 1: 91-148
- Bavister, BD.; Leibfried, ML. y Lieberman, G.** Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biol Reprod* **1983**; 28: 235-247
- Beatty, RA.** Parthenogenesis and polyploidy in mammalian development. Cambridge University Press, Cambridge, UK, **1957**
- Beck, LR y Boots LR.** The comparative anatomy, histology and morphology of the mammalian oviduct. In: *The oviduct and its functions*. Ed: Johnson AD and Foley CW. Academic Press, New York, USA, **1974**
- Beckmann, LS. y Day, BN.** Culture of the one- and two-cell porcine embryo: Effects of varied osmolarity in Witten's and Krebs's Ringer bicarbonate media. *Theriogenology* **1991**; 35: 184 (Abstr)
- Beckmann, LS. y Day, BN.** Effect of media NaCl concentration and osmolarity on culture of the early-stage porcine embryos and the viability of embryos cultured in a selected superior medium. *Theriogenology* **1993**; 39: 611-622
- Bedford, JM. y Cross, NL.** Sperm Capacitation. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA, **1999**; Vol 4: 597-602
- Beier, HM.** Oviductal and uterine fluids. *J Reprod Fertil* **1974**; 37: 221-237
- Berger, T.; Turner, KO.; Meizel, S. y Hedrick, JL.** Zona pellucida-induced acrosome reaction in boar sperm. *Biol Reprod* **1989**; 40: 525-530
- Berthelot, F. y Terqui, M.** Effects of oxygen, CO₂/pH and medium on the *in vitro* development of individually cultured porcine one- and two-cell embryos. *Reprod Nutr Dev* **1996**; 36: 241-251

- Betteridge, KJ. y Flechon, JE.** The anatomy and physiology of preattachment bovine embryos. *Theriogenology* **1988**; 29: 155-187
- Bhattacharyya, A. y Yanagimachi, R.** Synthetic organic pH buffers can support fertilization of guinea pig eggs, but not as efficiently as bicarbonate buffer. *Gamete Res* **1988**; 19: 123-129
- Biggers, JD y Borland, RM.** Physiological aspects of growth and development of the preimplantation mammalian embryo. *Ann Rev Physiol* **1976**; 38: 95-119
- Biggers, JD.; Lawitts, JA. y Lechene, CP.** The protective action of betaine on the deleterious effects of NaCl on preimplantation mouse embryos *in vitro*. *Mol Reprod Dev* **1993**; 34: 380-390
- Bleil, JD. y Wassarman, PM.** Sperm-egg interactions in the mouse. Sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol* **1983**; 95: 317-324
- Boatman, DE.** Responses of gametes to the oviductal environment. *Hum Reprod* **1997**; 12: 133-149
- Boatman, DE. y Robbins, RS.** Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. *Biol Reprod* **1991**; 44: 806-813
- Bolamba, D. y Sirard, MA.** Ovulation and follicular growth in gonadotropin-treated gilts followed *in vitro* fertilization and development of their oocytes. *Theriogenology* **2000**; 53: 1421-1437
- Boquest, AC.; Abeydeera, LR.; Wang, WH. y Day, BN.** Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos *in vitro*. *Theriogenology* **1999**; 51: 1311-1319
- Borland, RM.** Transport processes in the mammalian blastocyst. In: *Development in Mammals*. Ed: MH Johnson. North Holland, Amsterdam, Netherlands, **1977**; vol 1: 31-68
- Braden, AWH.; Austin, CR. y David, HA.** The reaction of the zona pellucida to sperm penetration. *Aust J Biol Sci* **1954**; 7: 391
- Brankin, V.; Webb, R. y Hunter, MG.** Factor(s) secreted by the porcine oocyte modulate granulosa cell growth and steroidogenesis. *J Reprod Fertil* **1999**; 23: 66 (Abstr Series)
- Brison, DR. y Schultz, RM.** Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor. *Biol. Reprod* **1997**; 56: 1088-1096
- Broermann, DM.; Xie, S.; Nephew, KP. y Pope, WF.** Ability of the oviduct to delay enzymatic digestion of the zona pellucida. *J Anim Sci* **1988**; 66 (Suppl 1): 416 (Abstr)

Bronson, RA. y Mc Laren, A. Transfer to the mouse oviduct of eggs with and without the zona pellucida. *J Reprod Fertil* **1970**; 22: 129-137

Buhi, WC.; Vallet, JL. y Bazer, FW. De novo synthesis and release of polypeptides from cyclic and early pregnant porcine oviductal tissue in explant culture. *J Exp Zool* **1989**; 252: 79-88

Buhi, WC.; O'Brien, B.; Alvarez, IM.; Erdos, G. y Dubois, D. Immunogold localization of porcine oviductal secretory proteins within the zona pellucida, perivitelline space, and plasma membrane of oviductal and uterine oocytes and early embryos. *Biol Reprod* **1993**; 48: 1274-1283

Buhi, WC.; Alvarez, IM. y Kouba, AJ. Secreted proteins of the oviduct. *Cells Tissues Organs* **2000**; 166: 165-179

Bureau, M.; Bailey, JL. y Sirard, MA. Influence of oviduct cells and conditioned media on porcine gametes. *Zygote* **2000**; 8: 139-144

Canipari, R. Cell-cell interactions and oocyte growth. *Zygote* **1994**; 2: 343-345

Carney, EW. y Bavister, BD. Stimulatory and inhibitory effects of aminoacids on the development of hamster eight-cell embryos *in vitro*. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* **1987**; 4: 162-167

Cheng, WTK. *In Vitro* Fertilization of Farm Animal Oocytes. Ph.D. thesis. Council for National Academic Awards, **1985**

Colon, I. y Raff, M. Size control in animal development. *Cell* **1999**; 96: 235-244

Coskum, S. y Lin, YC. Site of action of epidermal growth factor (EGF) on *in vitro* porcine oocyte maturation in chemically defined medium. *Biol Reprod* **1992**; 46: 138 (Abstr)

Coskum, S. y Lin, YC. Mechanism of action of epidermal growth factor-induced porcine oocyte maturation. *Mol Reprod Dev* **1995**; 42: 311-317

Coskun, S.; Uzumcu, M.; Lin, Y.; Friedman, CI. y Alak, BM. Regulation of granulosa cell steroidogenesis by the porcine oocyte and preliminary characterization of oocyte-produced factor(s). *Biol Reprod* **1995**; 53: 670-675

Cox, CI. y Leese, HJ. Retention of functional characteristics by bovine oviduct and uterine epithelia *in vitro*. *Anim Reprod Sci* **1997**; 46: 169-178

Coy, P.; Martínez, E.; Ruiz, S.; Vázquez, JM.; Roca, J. y Matas, C. Sperm concentration influences fertilization and male pronuclear formation *in vitro* in pigs. *Theriogenology* **1993**; 40: 539-546

Coy, P.; Ruiz, S.; Romar, R.; Campos, I. y Gadea, J. Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different systems. *Theriogenology* **1999**; 51: 799-812

- Cran, DG.** Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. *J Reprod Fertil* **1985**; 74: 237-245
- Cran, DG. y Cheng, WTK.** The cortical reaction in pig oocytes during *in vivo* and *in vitro* fertilization. *Gamete Res* **1986**; 13: 241-251
- Daen, FP.; Sato, E.; Naito, K. y Toyoda, Y.** The effect of pig follicular fluid fractions on cumulus expansion and male pronucleus formation in porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J Reprod Fertil* **1994**; 101: 667-673
- Dantzer, V.** Electron microscopy of the initial stages of placentation in the pig. *Anat Embryol* **1985**; 172: 281-293
- Das, K.; Stout, LE., Hensleingh, HC.; Tagatz, GE.; Phipps, WR. y Leung, BS.** Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. *Fertil Steril* **1991**; 55: 1000-1004
- Davis, DL.** Culture and storage of pig embryos. *J Reprod Fertil* **1985**; 33 (Suppl): 115-124
- Davis, DL. y Day, BN.** Cleavage and blastocyst formation by pig eggs *in vitro*. *J Anim Sci* **1978**; 46: 1043-1053
- Day, BN.** Reproductive biotechnologies: current status in porcine reproduction. *Anim Reprod Sci* **2000**; 60-61: 161-172
- Day, BN.; Abeydeera, LR. y Prather, RS.** Recent progress in pig embryo production through *in vitro* maturation and fertilization techniques” In: *Boar Semen Preservation IV*. Ed: Johnson LA and Guthrie HD. Allen Press Inc., Kansas, USA, **2000a**: 81-92
- Day, BN.; Abeydeera, LR.; Cantley, TC.; Rieke, A. y Murphy, CN.** Exposure of pig oocytes to estrus oviduct can influence the morphological, physical and *in vitro* fertilization parameters. *Theriogenology* **2000b**; 53: 418 (Abstr)
- Dekel, N.** Protein phosphorylation-dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. *Reviews of Reproduction* **1996**; 1: 82-88
- Dekel, N.** Meiotic cell cycle, oocytes. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA, **1999**; Vol 3: 168-176
- Dekel, N. y Scherizly, I.** Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle enclosed oocytes. *Endocrinology* **1985**; 116: 406-409
- DeMott, RP. y Suarez, SS.** Evidence for an advantage of hyperactivated mouse sperm in remaining free of the oviductal wall. *Biol Reprod* **1991**; 44 (Suppl 1): 117 (Abstr)
- DeMott, RP. y Suarez, SS.** Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol Reprod* **1992**; 46: 779-785

- Ding, J. y Foxcroft, GR.** Follicular heterogeneity and oocyte maturation *in vitro* in pigs. Biol Reprod **1992**; 47: 648-655
- Ding, J. y Foxcroft, GR.** Conditioned media produced by follicular shells of different maturity affect maturation of pig oocytes. Biol Reprod **1994a**; 50: 1377-1384
- Ding, J. y Foxcroft, GR.** Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. Mol Reprod Dev **1994b**; 39: 30-40
- Ding, J.; Clarke, N.; Nagai, T. y Moor, RM.** Protein and nuclear changes in pig eggs at fertilization. Mol Reprod Dev **1992a**; 31: 287-296
- Ding, J.; Moor, RM. y Foxcroft, GR.** Effects of protein synthesis on maturation, sperm penetration, and pronuclear development in porcine oocytes. Mol Reprod Dev **1992b**; 33: 59-66
- Dobrinsky, JR.; Johnson, LA. y Rath, D.** Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. Biol Reprod **1996**; 55: 1069-1074
- Dong, J.; Albertini, DF.; Nishimori, K.; Kumar, TR.; Lu, N. y Matzuk, MM.** Growth differentiation factor 9 is required during early ovarian folliculogenesis. Nature **1996**; 383: 531-535
- Downs, SM.; Daniel, SAJ, y Eppig, JJ.** 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 **1988**; 245: 86-96
- Du Mesnil Du Buisson, F. y Signoret, JP.** Utilisation du sperme de verrat pour l'insemination artificielle. Symposium Zagreb, **1971**: 41
- Du Mesnil Du Buisson, F.; Manleon, P.; Locatello, A. y Mariana, JC.** Modification du moment et de l'étalement des ovulations après maîtrise de cycle sexual de la truie. Colloque st. Nat. Etude Steril-Fertil l'inhibition de l'ovulation. Masson. Paris, 225. **1970**
- Dulcibella, T.** Surface changes of the developing trophoblast cells. In: Development in Mammals. Ed: MH Johnson. North Holland, Amsterdam, Netherlands, **1977**; vol 1: 5-30
- Dumont, JN y Brummett, AR.** Egg envelopes in vertebrates. In: Developmental Biology. Ed: Browder LW. Plenum Press, New York, USA, **1985**; vol 1: 235-288
- Duranthon, V. y Renard, JP.** The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. Theriogenology **2002**; 55: 1291-1301
- Dziuk, PJ.** Effect of migration, distribution and spacing of pig embryos on pregnancy and fetal survival. J Reprod Fertil **1985**; 33 (Suppl): 57-63
- Ebihara, M.; Nagai, T.; Onishi, A.; Kobayashi, T. y Kubo, M.** The stages of GV in pig follicular oocytes. Proc 87th Meeting Jpn Soc Zotech Sci **1993**; 273 (Abstr)

- Eppig, JJ.** Gonadotropin stimulation of the expansion of cumulus oophori isolated from mice: general conditions for expansion *in vitro*. *J Exp Zool* **1979**; 208: 111-120
- Espey, LL.** Ovulation. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA, **1999**; Vol 3: 605-614
- Exley, GE. y Carol, MW.** Zygotic Genomic Activation. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA, **1999**; Vol 4: 1041-1046
- Fazelli, A.; Duncan, AE.; Watson, PF. y Holt, WV.** Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol Reprod* **1999**; 60: 879-886
- Feng, P.; Knecht, M. y Catt, K.** Hormonal control of epidermal growth factor receptors by gonadotropins during granulosa cell differentiation. *Endocrinology* **1987**; 120: 1121-1126
- Fischer, B. y Bavister, BD.** Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters, and rabbits. *J Reprod Fertil* **1993**; 99: 673- 679
- Flesch, FM. y Gadella, BM.** Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta* **2000**; 1469: 197-235
- Flint, APF.** A unifying hypothesis for the control of blastocyst growth based on observations on the pig. *J Reprod Fertil* **1981**; 29 (Suppl): 215-227
- Flood, MR. y Wiebold, JL.** Glucose metabolism by preimplantation pig embryos. *J Reprod Fertil* **1988**; 84: 7-12
- Flowers, WL. y Esbenshade, KL.** Optimizing management of natural and artificial matings in swine. *J Reprod Fertil* **1993**; 48 (Suppl): 217-228
- Foote, NE. y Thibault, C.** Recherches experimentales sur la maturation *in vitro* des ovocytes de truie et de veals. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* **1969**; 9: 329
- Forsdike, RA. y Fraser, LR.** Relative importance of Ca^{2+} and HCO_3^- for capacitation and acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil* **1996**; 17: 4 (Abstr Series)
- Franchi, LL.; Mandl, A. y Zuckermann, S.** The development of the ovary and the process of oogenesis. In: *The ovarian*. Ed: S. Zuckermann. Academic Press, New York, USA, **1962**; Vol 1
- Fraser, LR.** Albumin is required to support the acrosome reaction but not capacitation in mouse spermatozoa *in vitro*. *J Reprod Fertil* **1985**; 74: 185-196
- Fraser, LR.** Ionic control of sperm function. *Reprod Fertil Dev* **1995**; 7: 905-925

- Fraser, LR. y Monks, NJ.** Cyclin nucleotides and mammalian sperm capacitation. *J Reprod Fertil* **1990**; 42 (Suppl): 9-12
- Fraser, LR.; Umar, G. y Sayed, S.** Na²⁺-requiring mechanism modulate capacitation and acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil* **1993**; 97: 539-549
- Fraser, LR.; Abeydeera, LR. y Niwa, K.** Ca²⁺-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol Reprod Dev* **1995**; 40: 233-241
- Freitag, M.; Dopke, HH.; Niemann, H. y Elsaesser, F.** Ontogeny of RNA synthesis in preimplantation pig embryos and the effect of antioestrogen on blastocyst formation *in vitro*. *J Reprod Fertil* **1988**; 1: 11 (Abstr Series)
- Fujinaga, H.; Yamoto, M.; Nakano, R. y Shima, K.** Epidermal growth factort binding sites in porcine granulosa cells and their regulation by follicular-stimulating hormone *Biol. Reprod* **1992**; 46: 705-709
- Fukui, Y.; Glew, AM.; Gandolfi, F. y Moor, RM.** *In vitro* culture of sheep oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* **1988**; 29: 883-891
- Funahashi, H. y Day, BN.** Effects of different serum supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Theriogenology* **1993a**; 39: 965-973
- Funahashi, H. y Day, BN.** Effects of follicular fluid at fertilization *in vitro* on sperm penetration in pig oocytes. *J Reprod Fertil* **1993b**; 99: 97-103
- Funahashi, H. y Day, BN.** Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil* **1993c**; 98: 179-185
- Funahashi, H. y Day, BN.** Current status of *in vitro* production of porcine embryos. In: *Advances in Swine in Biomedical Research*. Ed: Tomblason M. and Schook L. Plenum Press, New York, USA, **1996**: 491-502
- Funahashi, H. y Day, BN.** Advances in *in vitro* production of pig embryos. *J Reprod Fertil* **1997**; 52 (Suppl): 271-283
- Funahashi, H. y Nagai, T.** Regulation of *in vitro* penetration of frozen-thawed boar spermatozoa by caffeine and adenosine. *Mol Reprod Dev* **2001**; 58: 424-431
- Funahashi, H.; Cantley, TC. y Day, BN.** Different hormonal requirements of pig oocyte-cumulus complexes during maturation *in vitro*. *J Reprod Fertil* **1994a**; 101: 159-165
- Funahashi, H.; Cantley, TC.; Stumpf, TT.; Terlouw, SL. y Day, BN.** Use of low-salt culture medium for *in vitro* maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after *in vitro* fertilization. *Biol Reprod* **1994b**; 51: 633-639

Funahashi, H.; Cantley, TC.; Stumpf, TT.; Terlouw, SL. y Day, BN. *In vitro* development of *in vitro*-matured porcine oocytes following chemical activation or *in vitro* fertilization. *Biol Reprod* **1994c**; 50: 1072-1077

Funahashi, H.; Stumpf, TT.; Terlouw, SL.; Cantley, TC.; Rieke, A. y Day, BN. Developmental ability of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* **1994d**; 41: 1425-1433

Funahashi, H.; Kim, NH.; Stumpf, TT.; Cantley, TC. y Day, BN. Presence of organic osmolytes in maturation medium enhances cytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Biol Reprod* **1996a**; 54: 1412-1419

Funahashi, H.; Tatemoto, H.; Cantley, TC. y Day, BN. Nuclear morphology of swine oocytes during follicular development following stimulation by eCG injection. *Biol Reprod* **1996b**: 54 (Suppl): 156 (Abstr)

Funahashi, H.; Cantley, TC. y Day, BN. Preincubation of cumulus-oocyte complexes before exposure to gonadotropins improves the developmental competence of porcine embryos matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* **1997a**; 47: 679-686

Funahashi, H.; Cantley, TC. y Day, BN. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic AMP improves developmental competence following *in vitro* fertilization. *Biol Reprod* **1997b**; 47: 679-686

Funahashi, H.; McIntush, EW.; Smith, MF. y Day, BN. Effect of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) on early development of swine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* **1997c**; 47: 277 (Abstr)

Funahashi, H.; Asano, A.; Fujiwara, T.; Nagai, T.; Niwa, K. y Fraser, LR. Both fertilization promoting peptide and adenosine stimulate capacitation but inhibit spontaneous acrosome loss in ejaculated boar spermatozoa *in vitro*. *Mol Reprod Dev* **2000a**; 55: 117-124

Funahashi, H.; Fujiwara, T. y Nagai, T. Modulation of the function of boar spermatozoa via adenosine and fertilization promoting peptide receptors reduce the incidence of polyspermic penetration into porcine oocytes. *Biol Reprod* **2000b**; 63:1157-1163

Gaddum-Rosse, P. Mammalian gamete interactions: What can be gained from observations on living eggs?. *Am J Anat* **1985**; 173: 347-356

Galeati, G.; Modina, S.; Lauria, A. y Mattioli, M. Follicle somatic cells influence pig oocyte penetrability and cortical granule distribution. *Mol Reprod Dev* **1991**; 29: 40-46

Gandhi, AP.; Lane, M.; Gardner, DK. y Krisher, RL. Substrate utilization in porcine embryos cultured in NCSU23 and G1.2/g2.2 sequential culture media. *Mol Reprod Dev* **2001**; 58: 269-275

Gandolfi, F. y Moor, RM. Stimulation of early embryonic development in the sheep by coculture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fertil* **1987**; 81: 23-28

Garbers, DL.; First, NL.; Sullivan, JJ. y Lardy, HA. Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoa respiration and motility by caffeine. *Biol Reprod* **1971**; 5: 336-339

Garbers, DL.; First, NL.; Gorman, SK. y Lardy, HA. The effects of cyclin nucleotide phosphodiesterase inhibitors on ejaculated porcine spermatozoa metabolism. *Biol Reprod* **1973**; 8: 599-606

Gardner, DK. Culture of mammalian embryos in the absence of serum and somatic cells. *Cell Biology International* **1994**; 18: 1163-1179

Gardner, DK. Development of serum-free culture system for the ruminant embryo and subsequent assessment of embryo viability. *J Reprod Fertil* **1999**; 54 (Suppl): 461-475

Gardner, DK. y Lane, M. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod* **1993**; 48: 377-385

Gardner, DK.; Lane, M.; Spitzer, A. y Batt, PA. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acid, vitamins and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol Reprod* **1994**; 50: 390-400

Gardner, DK.; Lane, MW. y Lane, M. Development of the inner cell mass in mouse blastocysts is stimulated by reducing the embryo:incubation volume ratio. *Human Reprod* **1997**; 12: 132 (Abstr Book 1)

Gardner, DK.; Vella, P.; Lane, M.; Wagely, L.; Schlenker, T. y Schoolcraft, WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* **1998**; 69: 84-88

Geisert, RD. Pigs. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA, **1999**; Vol 3: 792-799

Gilula, NB.; Epstein, ML. y Beers, WH. Cell-to-cell communication and ovulation: a study of the cumulus-oocyte complex. *J Cell Biol* **1978**; 78: 58-75

Goto, Y.; Noda, Y.; Mori, T. y Nakano, M. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured *in vitro*. *Free Radical Biol Med* **1993**; 15: 69-76

Gruppen, CG. y Nottle, MB. A simple modification of the *in vitro* fertilization procedure improves the efficiency of *in vitro* pig embryo production. *Theriogenology* **2000**; 53: 422 (Abstr)

Gruppen, CG.; Nagashima, H. y Nottle, MB. Cysteamine enhances *in vitro* development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Biol Reprod* **1995**; 53: 173-178

Gruppen, CG.; Nagashima, H. y Nottle, MB. Role of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on porcine oocyte maturation and embryonic development *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* **1997**; 9: 571-575

- Guthrie, HD. y Garrett, WM.** Changes in germinal vesicle (GV) development during follicle maturation in pigs. *Biol Reprod* **1999**; 60 (Suppl): 186 (Abstr)
- Hafez, ESE.** Scanning electron microscopy of female reproductive tract. *J Reprod Med* **1972**; 9: 119-134
- Haley, CS. y Lee, GJ.** Genetic basis of prolificacy in Meishan pigs. *J Reprod Fertil* **1993**; 48 (Suppl): 247-259
- Hammerstedt, RH.** Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. *Reprod Fertil Dev* **1993**; 5: 675-690
- Hammond, JM.; Baranao, JLS.; Skaleris, D.; Knight, AB.; Romanus, JA. y Rechler, MM.** Production of insulin-like growth factors by ovarian granulose cells *Endocrinology* **1985**; 117: 2553-2555
- Han, YM.; Abeydeera, LR.; Kim, JH.; Moon, HB.; Cabot, RA.; Day, BN. y Prather, RS.** Growth retardation of inner cell mass cells in polyspermic porcine embryos produced *in vitro*. *Biol Reprod* **1999a**; 60: 1110-1113
- Han, YM.; Wang, WH.; Abeydeera, LR.; Petersen, AL.; Kim, JH.; Murphy, C.; Day, BN. y Prather, RS.** Pronuclear location before the first cell division determines ploidy of polyspermic pig embryos. *Biol Reprod* **1999b**; 61: 1340-1346
- Harper, KM.** Gamete and zygote transport. In: *The Physiology of Reproduction*. Ed: Knobil E, Neill JD. Raven Press, New York, USA, **1988**: Vol 1:103-134
- Harper, KM. y Brackett, BG.** Bovine blastocyst development after *in vitro* maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biol Reprod* **1993**; 48: 409-416
- Harrison, RAP.** Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* **1996**; 8: 581-594
- Harrison, RAP. y Vickers, SE.** Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil* **1990**; 88: 343-352
- Harrison, RAP.; Mairet, B. y Miller, NGA.** Flow cytometric studies of bicarbonate-mediated Ca^{2+} influx in boar sperm populations. *Mol Reprod Dev* **1993**; 35: 197-208
- Harrison, RAP.; Ashworth, PJC. y Miller, NGA.** Bicarbonate/ CO_2 , an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol Reprod Dev* **1996**; 45: 378-391
- Hedrick, JL. y Wardrip, NJ.** Topographical radiolabeling of zona pellucida glycoproteins. *J Cell Biol* **1982**; 95: 162 (Abstr)

Hedrick, JL.; Wardrip, NJ. y Berger, T. Differences in the macromolecular composition of the zona pellucida isolated from pig oocytes, eggs, and zygotes. *J Exp Zool* **1987**; 241: 257-262

Heller, DT. y Schultz, RM. Ribonucleoside metabolism by mouse oocytes: metabolic cooperativity between fully grown oocytes and cumulus cells. *J Exp Zool* **1980**; 214: 355-364

Hess, RA. Spermatogenesis, Overview. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA, **1999**; Vol 4: 539-545

Ho, Y.; Doherty, AS. y Schultz, RM. Mouse preimplantation embryo development *in vitro*: effect of sodium concentration in culture media on RNA synthesis and accumulation and gene expression. *Mol Reprod Dev* **1994**; 38: 131-141

Ho, Y.; Wiggsworth, K.; Eppig, JJ. y Schultz, RM. Preimplantation development of mouse embryo in KSOM: augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Mol Reprod Dev* **1995**; 41: 232-238

Hochi, SI.; Braun, J.; Miyamoto; Fukui, Y. y Oguri, N. Influence sera on *in vitro* hatching of equine blastocysts. *J Reprod Dev* **1994**; 40: 13-18

Holm, P. y Callesen, H. *In vivo* versus *in vitro* produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod Nutr Dev* **1998**; 38: 579-594

Hsu, CJ.; Holmes, SD. y Hammond, JM. Ovarian epidermal growth factor-like activity. Concentrations in porcine follicular fluid during follicular enlargement. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1987**; 147: 242-247

Hunter, AG. y Moor, RM, Stage dependent effects of inhibiting RNA and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*. *J Dairy Sci* **1987**; 70: 1646-1651

Hunter, MG. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction* **2000**; 5: 122-130

Hunter, MG.; Biggs, C.; Foxcroft, GR.; McNeilly, AS. y Tilton, JE. Comparisons of endocrinology and behavioural events during the periovulatory period in Meishan and White hybrid gilts. *J Reprod Fertil* **1993**; 97: 475-480

Hunter, MG.; Picton, HM.; Biggs, C.; Mann, GE.; McNeilly, AS. y Foxcroft, GR. Periovulatory endocrinology in high ovulating Meishan sows. *Endocrinology* **1996**; 150: 141-147

Hunter, RHF. Porcine ovulation after injection of human chorionic gonadotrophin. *Vet Rec* **1967**; 81: 21-23

Hunter, RHF. Polyspermic fertilization in pigs after tubal deposition of excessive numbers of spermatozoa. *J Exp Zool* **1973**; 183: 57-64

- Hunter, RHF.** Chronological and cytological details of fertilization and early embryonic development in the domestic pig, *Sus scrofa*. *Anat Rec* **1974**; 178: 169-186
- Hunter, RHF.** Mating, sperm transport in the female genital tract, and artificial insemination. In: *Physiology and Technology of Reproduction in Female Domestic Animals*. Academic Press, London, UK, **1980**, pp 140-144
- Hunter, RHF.** Pre-ovulatory arrest and periovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *J Reprod Fertil* **1984**; 72: 203-211
- Hunter, RHF.** The Fallopian tubes. Their role in fertility and infertility. Springer-Verlag, Berlin, Germany, **1988**
- Hunter, RHF.** Ovarian programming of gamete progression and maturation in the female genital tract. *Zool J Linn Soc-Lond* **1989**; 95: 117-124
- Hunter, RHF.** Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Mol Reprod Dev* **1991**; 29: 385-391
- Hunter, RHF.** Sperm:egg ratios and putative molecular signals to modulate gamete interactions in polytocous mammals. *Mol Reprod Dev* **1993**; 35: 324-327
- Hunter, RHF.** Ovarian endocrine control of sperm progression in the Fallopian tubes. *Oxford Rev Reprod Biol* **1995**; 17: 85-124
- Hunter, RHF.** Polyspermy. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA, **1999**; Vol 3: 930-937
- Hunter, RFH. y Nichol, R.** Capacitation potential of the fallopian tube: a study involving surgical insemination and the subsequent incidence of polyspermy. *Gamete Res* **1988**; 21: 255-266
- Hunter, RHF.; Huang, WT. y Holtz, W.** Regional influences of the Fallopian tubes on the rate of boar sperm capacitation in surgically inseminated gilts. *J Reprod Fert* **1998**; 114: 17-23
- Hyne, RV.** Bicarbonate- and calcium-dependent induction of rapid guinea pig sperm acrosome reactions by monovalent ionophores. *Biol Reprod* **1984**; 31: 312-323
- Inoue, M.; Naito, K.; Aoki, F.; Toyoda Y. y Sato, E.** Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote* **1995**; 3: 265-271
- Iritani, A.; Niwa, K. y Imai, H.** Sperm penetration of pig follicular oocytes matured in culture. *J Reprod Fertil* **1978**; 54: 379-383
- Iwamatsu, T. y Chang, MC.** Factors involved in the fertilization of mouse eggs *in vitro*. *J Reprod Fertil* **1971**; 26: 197-208

- Jaffe, LF.** The role of calcium explosions, waves, and pulses in activating eggs. In: Biology of Fertilization. Ed: Metz, CB. and Monroy. Academic Press, Orlando, USA, **1985**; Vol 3: 127-165
- Jarrell, VL.; Day, BN. y Prather, RS.** The transition from maternal to zygotic control of development occurs during the 4-cell stage in the domestic pig, *sus scrofa*: quantitative and qualitative aspects of protein synthesis. Biol Reprod **1991**; 44: 62-68
- Jeong, BS. y Yang, X.** Cysteine, glutathione and percoll treatments improve porcine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. Mol Reprod Dev **2001**; 59: 330-335
- Johnson, MH.** The molecular and cellular basis of preimplantation mouse development. Biol Rev **1981**; 56: 463-498
- Jones, R.** Identification and functions of mammalian sperm-egg recognition molecules during fertilization. J Reprod Fertil **1990**; 42 (Suppl): 89-105
- Jones, R.** Interaction of zona pellucida glycoproteins, sulphated carbohydrates and synthetic polymers with proacrosin, the putative egg-binding protein from mammalian spermatozoa. Development **1991**; 111: 1155-1163
- Ka, HH.; Sawai, K.; Wang, WH.; Im, KS. y Niwa, K.** Amino acids in maturation media and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated *in vitro*. Biol Reprod **1997**; 57: 1478-1483
- Kaekuahiwi, MA. y Menino, AR. Jr.** Relationship between plasminogen activator production and bovine embryo development *in vitro*. J Anim Sci **1990**; 68: 2009-2014
- Kan, M. y Yamane, I.** Oxygen-dependent growth declining and effect of vitamin E for human diploid fibroblasts in serum-free, BSA-containing culture. Tohoku J Exp Med **1983**; 139: 389-398
- Kano, K.; Miyano, T. y Kato, S.** Effect of oviductal epithelial cells on fertilization of pig oocytes *in vitro*. Theriogenology **1994**; 42: 1061-1068
- Kano, K.; Miyano, T. y Kato, S.** Effects of glycosaminoglycans on the development of *in vitro* matured and fertilized porcine oocytes to the blastocyst stage *in vitro*. Biol Reprod **1998**; 58: 1226-1232
- Kaye, PL.** Metabolic aspects of the physiology of the preimplantation embryo. Ed: Rossant, J. and Pedersen, RA. Cambridge University Press, Cambridge, UK, **1986**: pp. 267-292
- Keskintepe, L. y Brackett, BG.** *In vitro* developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. Biol Reprod **1996**; 55: 333-339

Kidson, A.; Colenbrander, B.; Verheijden, JHM. y Bevers, MM. Polyspermy in the pig is dependent on both IVF medium and sperm dose during fertilization *in vitro*. In: Proceedings 6th International Conference on Pig Reproduction **2001**; 75 (Abstr)

Kikuchi, K.; Nagai, T.; Motlik, J.; Shioya, Y. y Izaike, Y. Effect of follicle cells on *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes. *Theriogenology* **1993**; 39: 593-599

Kikuchi, K.; Naito, K.; Daen, FP.; Izaike, Y. y Toyoda, Y. Histone H1 kinase activity during *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* **1995**; 43: 523-532

Kim, NH.; Funahashi, H., Abeydeera, LA.; Moon, SJ.; Prather, RS. y Day, BN. Effects of oviductal fluid on sperm penetration and cortical granule exocytosis during *in vitro* fertilization of porcine oocytes. *J Reprod Fertil* **1996**, 107: 79-86

Koo, DB.; Kim, NH.; Lee, HT. y Chung, KS. Effects of fetal calf serum, amino acids, vitamins and insulin on blastocoel formation and hatching of *in vivo* and IVM/IVF-derived porcine embryos developing *in vitro*. *Theriogenology* **1997**; 48: 791-802

Kopf, GS. Acrosome reaction. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA, **1999**; Vol 1: 17-26

Kouba, AJ.; Abeydeera, LR.; Alvarez, IM.; Day, BN. y Buhi, WC. Effects of porcine oviduct-specific glycoprotein (pOSP) on fertilization and polyspermy. *Biol Reprod* **1999**; 60 (Suppl): 228 (Abstr)

Kouba, AJ.; Abeydeera, LR.; Alvarez, IM.; Day, BN. y Buhi, WC. Effects of porcine oviduct-specific glycoprotein on fertilization, polyspermy and embryonic development *in vitro*. *Biol Reprod* **2000**; 63: 242-250

Kriser, RL.; Petters, RM.; Johnson, BH.; Bavister, BD. y Archibong, AE. Development of porcine embryos from the one-cell stage to the blastocyst in mouse oviducts maintained in organ culture. *J Exp Zool* **1989** 249: 235-239

Krisher, RL.; Ghandi, AP.; Gardner, DK. y Lane, M. Developmentally related changes in nutrient uptake and metabolism by *in vitro* produced porcine embryos. *Theriogenology* **2000**; 53: 274 (Abstr)

Labadía, A. Bases fisiológicas de la reproducción en la hembra. En: *Fisiología Veterinaria*. Ed: García, A.; de la Cruz, LF.; González, J.; Murillo, MD. Y Salido, G. Mc Graw-Hill. Interamericana, Madrid, España, **1995**: 840-860

Lane, M. y Gardner, DK. Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos *in vitro*. *Human Reprod* **1992**; 7: 558-562

Lane, M. y Gardner, DK. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J Reprod Fertil* **1997**; 109: 153-164

- Langlais, J. y Roberts, KD.** A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res* **1985**; 12: 183
- Lawitts, JA. y Biggers, JD.** Joint effects of sodium chloride, glutamine, and glucose in mouse preimplantation embryo culture media. *Mol Reprod Dev* **1992**; 31: 189-194
- Lee, CN. y Ax, RL.** Concentration and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *J Dairy Sci* **1984**; 67: 2006-2009
- Lee, CN.; Handrow, RR.; Lenz, RW. y Ax, RL.** Interactions of seminal plasma and glycosaminoglycans on acrosome reactions in bovine spermatozoa *in vitro*. *Gamete Res* **1985**; 12: 345-355
- Lee, HT.; Uhm, SJ.; Chung, HM.; Chung, HJ.; Ko, DH. y Chung, KS.** *In vitro* development and remodeling of porcine nuclear transfer embryos with porcine or mouse fibroblast cells. *Theriogenology* 2001; 55: 278 (Abstr)
- Lee, MA. y Storey, BD.** Bicarbonate is essential for fertilization of mouse eggs: mouse sperm requires to undergo the acrosome reaction. *Biol Reprod* **1986**; 34: 349-356
- Leese, HJ.** Studies of the movement of glucose, pyruvate and lactate into the ampulla and isthmus of the rabbit oviduct. *J Exp Physiol* **1983**; 68: 89-96
- Leese, HJ.** The formation and function of oviduct fluid. *J Reprod Fertil* **1988**; 82: 843-856
- Leese, HJ.; Biggers, JD.; Mroz, EA. y Lechene, C.** Nucleotides in a single mammalian ovum or preimplantation embryo. *Anal Biochem* **1984**; 140: 443-448
- Liu, L.; Dai, Y. y Moor, RM.** Role of secreted proteins and gonadotropins in promoting full maturation of porcine oocytes *in vitro*. *Mol Reprod Dev* **1997**; 47: 191-199
- Lonergan, P.; Carolan, C.; Van Langendonck, A.; Donnay, I; Khatir, H. y Mermillod, P.** Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. *Biol Reprod* **1996**; 54: 1420-1429
- Long, CR.; Dobrinsky, JR. y Johnson, LA.** *In vitro* production of pig embryos: comparisons of culture media and boars. *Theriogenology* **1999**; 51: 1375-1390
- Lorenzo, PL.; Illera, MJ.; Illera, JC. e Illera, M.** 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* **1994**; 101: 697-701
- Machaty, Z.; Day, BN. y Prather, RS.** Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*. *Biol Reprod* **1998**; 59: 451-455
- Machaty, Z.; Thompson, JG.; Abeydeera, LR.; Day, BN. y Prather, RS.** Inhibitors of mitochondrial ATP production at the time of compaction improve development of *in vitro* produced porcine embryos. *Mol Reprod Dev* **2001**; 58: 39-44

- Marchal, R., Feugang, JM.; Perreau, C.; Venturi, E.; Terqui, M. y Mermillod, P.** Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology* **2001**; 56: 17-29
- Martínez, E.; Ruiz, S.; Roca, J y Vázquez, JM.** Fecundación *in vitro* en los animales de granja. Ed: Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Murcia. Murcia, España, **1989**
- Martínez, E.; Vázquez, JM.; Matas, C.; Gadea, J.; Alonso, M y Roca, J.** Oocyte penetration by fresh or stored diluted boar spermatozoa before and after *in vitro* capacitation treatments. *Biol Reprod* **1996**; 55: 134-140
- Martínez-Madrid, B.; Domínguez, E.; Alonso, C.; Díaz, C.; García, P. y Sánchez, R.** Effect of IVF medium and sperm concentration on fertilization parameters. In: Proceedings 6th International Conference on Pig Reproduction **2001**; 74 (Abstr)
- Martínez-Madrid, B.; Domínguez, E.; Díaz, C.; García, P. y Sánchez, R.** Effect of oocyte selection on *in vitro* fertilization of pig embryos. In: Proceedings International Pig Veterinary Society 2002; 675 (Abstr)
- Masui, Y. y Markert, CL.** Cytoplasmatic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* **1971**; 177: 129-145
- Matás, C.; Marco, M.,; Coy, P.; Gadea, R.; Romar, R. y Garcia, E.** The effect of different treatments of sperm on porcine *in vitro* fertilization. *Theriogenology* **2002**; 57: 676 (Abstr)
- Mattioli, M.** Transduction mechanism for gonadotropin-induced oocyte maturation in mammals. *Zygote* **1994**; 2: 347-349
- Mattioli, M.; Galeati, G. y Seren, E.** Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. *Gamete Res* **1988a**; 20: 177-183
- Mattioli, M.; Galeati, G.; Bacci, ML. y Seren, E.** Follicular factors influence oocyte fertilizability by modulating the intercellular cooperation between cumulus cells and oocyte. *Gamete Res* **1988b**; 21: 223-232
- Mattioli, M.; Bacci, ML.; Galeati, G. y Seren, E.** Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* **1989**; 31: 1201-1207
- Mattioli, M.; Bacci, ML.; Galeati, G. y Seren, E.** Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes *in vitro*. *Theriogenology* **1991**; 236: 95-105
- Mattioli, M; Barboni, B.; Lucidi, P. y Seren, E.** Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. *Theriogenology* **1996**; 45: 373-381
- Mattioli, M.; Lucidi, P. y Barboni, B.** Expanded cumuli induce acrosome reaction in boar sperm. *Mol Reprod Dev* **1998**; 51: 445-453

Maurer, HR. Towards serum-free, chemically defined media for mammalian cell culture. In: *Animal Cell Culture: A Practical Approach* (Second Edition). Ed: Freshney RI. University Press, Oxford, UK, **1992**: 15-46

May, JV. y Schomberg, DW. The potential relevance of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha to ovarian physiology. *Semin Reprod Endocrinol* **1989**; 7: 1-11

Mburu, JN.; Rodríguez-Martínez, H. y Einarsson, S. Changes in sperm ultrastructure and localisation in the porcine oviduct around ovulation. *Anim Reprod Sci* **1997**; 41:137-148

McCauley, TC.; Buhi, WC.; Didion, BA. y Day, BN. Exposure of oocytes to porcine oviduct-specific glycoprotein reduces the incidence of polyspermic penetration *in vitro*. In: *Proc 6th Int Conf Pig Reprod* **2001**; 47 (Abstr)

McEnvoy, TG.; Robinson, JJ.; Carolan, C.; Staines, ME.; Broadbent, PJ. y Sinclair, KD. Ovine fetal development following embryo culture in synthetic oviduct fluid with added ammonium. *Theriogenology* **1999**; 51: 247 (Abstr)

McGowan, LT. y Thompson, JG. Perfusion culture of bovine *in vitro* produced embryos. *Proc Aust Soc Reprod Biol* **1997**; 29: 24

McKiernan, SH. y Bavister, BD. Timing of development is a critical parameter for predicting successful embryogenesis. *Hum Reprod* **1994**; 9: 2123-2129

McLaren, A. y Smith, R. Functional test of tight junctions in the mouse blastocyst. *Nature* **1977**; 267: 351-353

McRae, A. The blood-uterine lumen barrier and exchange between extracellular fluids. *J Reprod Fertil* **1988**; 82: 857-873

Mehta, TS. y Kiessling, AA. Developmental potential of mouse embryos conceived *in vitro* and cultured in ethylenediaminetetraacetic acid with or without amino acids or serum. *Biol Reprod* **1990**; 43: 600-606

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

Meinecke, B. y Meinecke-Tillmann, S. Induction and inhibition of meiotic maturation of follicle-enclosed porcine oocytes *in vivo*. *Theriogenology* **1981**; 15: 581

Meister, A. Selective Modification of Glutathione Metabolism. *Science* **1983**; 220: 472-477

Meister, A. y Anderson, ME. Glutathione. *An Rev Bioch* **1983**; 52: 711-760

Meister, A. y Tate, SS. Glutathione and the related γ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Ann Rev Biochem* **1976**; 45: 559-604

Menino, AR. Jr. y Wright, RW. Jr. Development of one-cell porcine embryos in two culture systems. *J Anim Sci* **1982**; 54: 583-588

Meyen, BA.; Rosenkrans, CF. Jr. y Davis, DL. Development of pig blastocysts *in vitro* is altered by serum, bovine serum albumin and aminoacids and vitamins. *Theriogenology* **1989**; 31: 463-471

Miller, JGO. y Schultz, GA. Amino acid content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract. *Biol Reprod* **1987**; 36: 125-129

Millette, CF. Spermatozoa. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA, **1999**; Vol 4: 586-596

Misener, M. Pollard, JW. y Metzger, K. *In vitro* culture of porcine embryos in CZB medium. *Theriogenology* **1991**; 35: 244 (Abstr)

Miyano, T.; Hiro-oka, RE.; Kano, K.; Miyake, M.; Kusunoki, H. y Kato, S. Effects of hyaluronic acid on the development of 1- and 2-cell porcine embryos to the blastocys stage *in vitro*. *Theriogenology* **1994**; 41: 1299-1305

Miyano, T.; Ebihara, M.; Goto, Y.; Hirao, Y.; Nagai, T. y Kato, S. Inhibitory action of hypoxanthine on meiotic resumption of denuded pig follicular oocytes *in vitro*. *J Exp Zool* **1995**; 273: 70-75

Modlinski, JA. The role of the zona pellucida in the development of mouse eggs *in vivo*. *J Embryol Exp Morphol* **1970**; 23: 539-547

Moor, RM. Contact signalling and cooperation between follicle cells and dictyate oocytes in mammals. *Current Problems in Germ Cell Differentiation in mammals*. Eds. A. McLaren and CC. Wylie. Cambridge University Press, Cambridge, UK, **1983**

Moor, RM. y Crosby, IM. Cellular origin, hormonal regulation and biochemical characteristics of polypeptides secreted by Graafian follicles of sheep. *J Reprod Fertil* **1987**; 79: 469-483

Moor, RM.; Mattioli, M.; Ding, J. y Nagai, T. Maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J Reprod Fertil* **1990**; 40 (Suppl): 197-210

Moore, HDM. y Bedford, JM. The interaction of mammalian gametes in the female. In: *Mechanism and Control of Animal Fertilization*. Ed: Hartmann JF. Academic Press, New York, USA, **1983**: 453-497

Mori, T.; Hirayama, M.; Suzuki, K.; Shimizu, H. y Nagai, T. Effect of casein phospho peptides and Ca^{2+} on penetration of boar spermatozoa into pig oocytes matured *in vitro*. *Biol Reprod* **1996**; 55: 364-369

- Mori, T.; Amano, T. y Shimizu, H.** Roles of gap junctional communication of cumulus cell in cytoplasmic maturation of porcine oocytes cultured *in vitro*. *Biol Reprod* **2000**; 62: 913-919
- Motlik, J. y Fulka, J.** Fertilization of pig follicular oocytes cultivated *in vitro*. *J Reprod Fertil* **1974**; 36: 235-237
- Motlik, J. y Fulka, J.** Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J Exp Zool* **1976**; 198: 155-162
- Motlik, J; Crozet, N.; Fulka, J. y Flechon, JE.** Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J Reprod Fertil* **1984**; 72: 323-328
- Motlik, J; Fulka, J. y Flechon, JE.** Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation *in vivo* and *in vitro*. *J Reprod Fertil* **1986**; 76: 31-37
- Murray, SC. y Smith, TT.** Sperm interaction with Fallopian tube apical membrane enhances sperm motility and delays capacitation. *Fertil Steril* **1997**; 68: 351-357
- Murray, FA. Jr.; Bazer, FW. ; Wallace, HD. y Warnick, AC.** Quantitative and qualitative variation in the secretion of protein by the porcine uterus during the estrous cycle. *Biol Reprod* **1972**; 7: 314-320
- Myles, DG. y Primakoff, P.** Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol Reprod* **1997**; 56: 320-327
- Nagai, T.** Current status and perspectives in IVM-IVF of porcine oocytes. *Theriogenology* **1994**; 41: 73-78
- Nagai, T.** *In vitro* maturation and fertilization of pig oocytes. *Anim Reprod Sci* **1996**; 42: 153-163
- Nagai, T.** The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology* **2001**; 55: 1291-1301
- Nagai, T. y Moor, RM.** Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized *in vitro*. *Mol Reprod Dev* **1990**; 26: 377-382
- Nagai, T.; Niwa, K. e Iritani, A.** Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization *in vitro* of pig follicular oocytes. *J Reprod Fertil* **1984**; 70: 271-275
- Nagai, T.; Takahashi, T.; Masuda, Y.; Shioya, Y.; Kuwayama, M.; Fukushima, M.; Iwasaki, S. y Hanada, A.** *In vitro* fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *J Reprod Fertil* **1988**; 84: 585-591
- Nagai, T.; Ding, J. y Moor, RM.** Effect of follicle cells and steroidogenesis on maturation and fertilization *in vitro* of pig oocytes. *J Exp Zool* **1993**; 266: 146-151

Nagai, T.; Takenaka, A.; Mori, T. y Hirayama, M. Effects of caffeine and casein phosphopeptides on fertilization *in vitro* of pig oocytes matured in culture. *Mol Reprod Dev* **1994**; 37: 452-456

Nagashima, H.; Grupen, CG.; Ashman, RJ. y Nottle, MB. Developmental competence of *in vivo* and *in vitro* matured porcine oocytes after subzonal sperm injection. *Mol Reprod Dev* **1996**; 45: 359-363

Nagyova E.; Prochazka, R. y Motlik, J. Porcine oocytes produce CEEF only during their growth period and transition to metaphase 1. *Theriogenology* **1997**; 47: 197 (Abstr)

Naito, K.; Fukuda, Y. y Toyoda, Y. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured *in vitro*. *Gamete Res* **1988**; 21: 289-295

Naito, K.; Daen, FP. y Toyoda, Y. Comparison of histone H1 kinase activity during meiotic maturation between two types of porcine oocytes matured in different media *in vitro*. *Biol Reprod* **1992**; 47: 43-47

Neill, JM. y Olds-Clarke, P. A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. *Gamete Res* **1987**; 18: 121-140

Nichol, R.; Hunter, RHF.; Gardner, DK.; Leese, HJ. y Cooke, GM. Concentrations of energy substrates in oviductal fluid and blood plasma of pigs during peri-ovulatory period. *J Reprod Fertil* **1992**; 96: 699-707

Nichol, R.; Hunter, RHF.; Gardner, DK.; Partridge, R.; Leese, HJ. y Cooke, GM. Concentrations of energy substrates in oviduct fluid in unilaterally ovariectomised pigs. *Res Vet Sci* **1998**; 65: 263-264

Niemann, H. y Rath, D. Progress in reproductive biotechnology in swine. *Theriogenology* **2001**; 56: 1291-1304

Niemann, H.; Illera, MJ. y Dziuk, PJ. Developmental capacity, size and number of nuclei in pig embryos cultured *in vitro*. *Anim Reprod Sci* **1983**; 5: 311-322

Nikolopoulou, M; Soucek, DA. y Vary, JC. Modulation of the lipid composition of boar sperm plasma membranes during and acrosome reaction *in vitro*. *Arch. Biochem Biophys* **1986**; 250: 30-37

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

Niwa, K. y Ohgoda, O. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology* **1988**; 30: 733-741

O'Brien, JK.; Dwartte, D.; Ryan, JP.; Maxwell, WMC. y Evens, G. Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. *Reprod Fertil Dev* **1996**; 8: 1029-1037

- O'Neill, C.** Evidence for the requirement of autocrine growth factors for the development of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Biol Reprod* **1997**; 56: 229-237
- O'Neill, C.** Autocrine mediators are required to act on the embryo by the 2-cell stage to promote normal development and survival of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Human Reprod* **1998**; 13: 1303-1309
- O'Rand, MG.; Welch, JE. y Fisher, SJ.** Sperm membrane and zona pellucida interactions during fertilization. In: *Molecular and Cellular Aspects of Reproduction*. Ed: Dhindsa, DS. and Bahl, OP. Plenum Press, New York, USA, **1986**: 131-144
- Ocampo, MB.; Ocampo, LC.; Ryu, IS.; Mori, T.; Ueda, J. y Kanagawa, H.** Effects of culture time, ovarian activity, cumulus cells and sera on the nuclear and cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. *Anim Reprod Sci* **1993**; 34: 135-146
- Okada, A.; Yanagimachi, R. y Yanagimachi, H.** Development of a cortical granule-free area of cortex and the perivitelline space in the hamster oocyte during maturation and following fertilization. *J Submicrosc Cytol* **1986**; 18: 233-247
- Okamura, N.; Tajima, Y.; Soejima, A.; Masuda, H. y Sugita, Y.** Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J Biol Chem* **1985**; 260: 9699-9705
- Oko, RO. y Clermont, Y.** Spermiogenesis. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA, **1999**; Vol 4: 602-609
- Oliphant, G. y Eng, LA.** Collection of gametes in laboratory animals and preparation of sperm for *in vitro* fertilization. In: *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*. Ed: L. Mastroianni and JD. Biggers. Plenum Press. London, UK, **1981**: 11-26
- Osborn, JC. y Moor, RM.** The role of steroid signals in the maturation of mammalian oocytes. *J Steroid Biochem* **1983**; 19: 133-137
- Palma, GA.; Clement-Segewald, A.; Berg, U. y Brem, G.** Role of the embryo number in the development of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology* **1992**; 37: 271 (Abstr)
- Papaioannou, VE. y Ebert, KM.** The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Development* **1988**; 102: 793-803
- Paria, PC. y Dey, SK.** Preimplantation embryo development *in vitro*: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc Nat Acad Sci, USA* **1990**; 87: 3756-3760
- Parks, JE. y Hammerstedt, RH.** Developmental changes occurring in the lipid of ram epididymal sperm plasma membranes. *Biol Reprod* **1985**; 32: 653-668

- Parry, RV.; Barker, PJ. y Jones, R.** Characterization of low Mr zona pellucida binding proteins from boar spermatozoa and seminal plasma. *Mol Reprod Dev* **1992**; 33: 108-115
- Partridge, RJ. y Leese, HJ.** Consumption of amino acids by bovine preimplantation embryos. *Reprod Fertil Dev* **1996**; 8: 945-950
- Pemble, LB. y Kaye, PL.** Whole protein uptake by mouse blastocysts. *J Reprod Fertil* **1986**; 78: 149-157
- Perreault, SD.; Barbee, RR. y Slott, VI.** Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensation activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol* **1988**; 125: 181-186
- Petters, RM. y Reed, ML.** Addition of taurine or hypotaurine to culture medium improves development of one- and two-cell pig embryos *in vitro*. *Theriogenology* **1991**; 35: 253 (Abstr)
- Petters, RM. y Wells, KD.** Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil* **1993**; 48 (Suppl): 61-73
- Petters, RM.; Johnson, BH.; Reed, ML. y Archibong, AE.** Glucose, glutamine and inorganic phosphate in early development of the pig embryo *in vitro*. *J Reprod Fertil* **1990**; 89: 269-275
- Phillips, DM.; Jones, R. y Shalgi, R.** Alterations in distribution of surface and intracellular antigens during epididymal aturation in rat spermatozoa. *Mol Reprod Dev* **1991**; 29: 347-356
- Polanski, Z. y Kubiak, JZ.** Meiosis. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, **1999**; Vol 3: 160-167
- Polejaeva, IA.; Chen, SH.; Vaught, TD.; Page, RL.; Mullins, J.; Ball, S.; Dal, Y.; Boano, J.; Walker, S.; Ayares, D.; Colman, A. y Campbell, KHS.** Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* **2000**; 407: 505-509
- Polge, C.** Fertilization in the pig and horse. *J Reprod Fertil* **1978**; 54: 461-470
- Pope, CE. y Day, BN.** Transfer of preimplantation pig embryos following *in vitro* culture for 24 or 48 h. *J Anim Sci* **1977**; 44: 1036-1040
- Presicce, GA.; Jiang, S.; Simkin, M.; Zhang, J.; Looney, CR.; Godke, RA. y Yang, X.** Age and hormonal dependence of acquisition of oocytes competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biol Reprod* **1997**; 56: 386-392
- Prochazka, R.; Srsen, V.; Nagyova, E.; Miyano, T. y Flechon, JE.** Developmental regulation of effect of epidermal growth factor on porcine oocyte-cumulus cell complexes: nuclear maturation, expansion, and F-actin remodeling. *Mol Reprod Dev* **2000**; 56: 63-73

Pursel, VG.; Johnson, LA. y Rampacek, GB. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J Anim Sci* **1972**; 34: 278-283

Rath, D. Experiments to improve *in vitro* fertilization techniques for *in vivo*-matured porcine oocytes. *Theriogenology* **1992**; 37: 885-896

Rath, D. Experimentelle untersuchungen zur *in-vitro*-erzeugung präimplantatorischer schweineembryonen Ph.D. thesis. Habilschr Tierärztliche Hochschule, Hannover, Germany, **1996**

Rath, D. y Niemann, H. *In vitro* fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology* **1997**; 47: 785-793

Rath, D.; Long, CR.; Dobrinsky, JR.; Welch, GR.; Schreier, LL. y Johnson, LA. *In vitro* production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *J Anim Sci* **1999**; 77: 3346-3352

Rieger, D.; Loskutoff, NM. y Betteridge, KJ. Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and piruvate by cattle embryos produced *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* **1992**; 4: 547-557

Rijnders, PM. y Jansen, CAM. Influence of group culture and culture volume on the formation of human blastocysts: a prospective randomized study. *Human Reprod* **1999**; 14: 2333-2337

Robitalle, G.; St-Jacques, S.; Potier, M. y Bleau, G. Characterization of an oviductal glycoprotein associated with the ovulated hamster oocyte. *Biol Reprod* **1988**; 38: 687-694

Robl, JM. y Davis, DL. Effects of serum on swine morulae and blastocysts *in vitro*. *J Anim Sci* **1981**; 52: 1450-1456

Robl, JM. y Fissore, RA. Gametes, Overview. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA, **1999**; vol 2: 430-434

Rodríguez-Martínez, H.; Ekwall, H. y Plöen, L. Ultrastructure and innervation of smooth muscle in the porcine oviduct. *Zbl Vet Med C* **1985**; 14: 33-46

Rodríguez-Martínez, H.; Nicander, L.; Viring, S.; Einarsson, S. y Larson, K. Ultrastructure of uterotubal junction in preovulatory pigs. *Anat Histol Embryol* **1990**; 19: 16-36

Rodríguez-Martínez, H.; Han, Y.; Song, X.; Funahashi, H. y Niwa, K. Production of hyaluronic acid by porcine oocyte-cumulus cells complexes during *in vitro* maturation. In: *Proc 5th Int Conf Pig Reprod* **1997**;139 (Abstr)

Rodríguez-Martínez, H.; Larsson, B.; Pertoft, H. y Kjellen, L. GAGs and spermatozoon competence *in vivo* and *in vitro*. In: *Gametes: Development and Function*.

Ed: Lauria A, F Gandolfi, G Enne, L Gianaroli. Sero Symposia. Rome, Italy, **1998a**: 239-274

Rodríguez-Martínez, H.; Pertoft, H. y Johansson, M. Cryo-scanning electron microscopy of the porcine oviduct and immunocytochemical localization of hyaluronan in the endosalpinx. *Theriogenology* **1998b**; 49: 335 (Abstr)

Romar, R. Efecto de las células oviductales y del cúmulus oophorus sobre diferentes parámetros relacionados con la fecundación *in vitro* en la especie porcina. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, **2001**

Rosenkrans, CF. Jr.; Davis, DL. y Milliken, G. Pig blastocyst development *in vitro* is affected by aminoacids. *J Anim Sci* **1989**; 67: 1503-1508

Sacco, AG.; Subramanian, MG. y Yurewicz, EC. Association of sperm receptor activity with a purified pig zone antigen (PPZA). *J Reprod Immunol* **1984**; 6: 89-103

Sacco, AG.; Yurewicz, EG. y Subramanian, MG. Carbohydrate influences the immunogenic and antigenic characteristics of the ZP3 macromolecule (Mr 55000) of the pig zona pellucida. *J Reprod Fertil* **1986**; 76: 575-586

SAS 1998. SAS Institute Inc, Cary NC

Sato, E.; Miyamoto, H. y Koide, SS. Glycosaminoglycans in porcine follicular fluid promoting viability of oocytes in culture. *Mol Reprod Dev* **1990**; 26: 391-397

Sawai, F.; Funahashi, H. y Niwa, K. Stage-specific requirement of cysteine during *in vitro* maturation of porcine oocytes for glutathione synthesis associated with male pronuclear formation. *Biol Reprod* **1997**; 57: 1-6

Schini, SA. y Bavister, BD. Development of golden hamster embryos through the two-cell block in chemically-defined medium. *J Exp Zool* **1988**; 245: 111-115

Schultz, GA. y Heyner, S. Growth factors in preimplantation mammalian embryos. Ed: Milligan, SR. *Oxford Rev Reprod Biol* **1993**; 15: 43-82

Schultz, RM. Meiotic maturation on mammalian oocytes. In: *Elements of Mammalian Fertilization*. Ed: Wassarman PM. CRC Press, Boston, USA, **1991**: 77-104

Seshagiri, PB. y Bavister, BD. Relative developmental abilities of hamster 2- and 8-cell embryos cultured in hamster embryo culture medium -1 and -2. *J Exp Zool* **1991a**; 257: 51-57

Seshahiri, PB. y Bavister, BD. Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: evidence for the "crabtree effect". *Mol Reprod Dev* **1991b**; 30: 105-111

Shores, EM. Regulation of porcine theca cell function. PhD thesis. University of Nottingham, **1999**

Sidler, X.; Zimmermann, W. y Leiser, R. Das normale zyklische Geschehen im endometrium des schweines. University of Bern, Bern, **1986**

Simmen, RCM.; Ko, Y.; Liu, XH.; Wilde, MH.; Pope, WF. y Simmen, FA. A uterine cell mitogen distinct from epidermal growth factor in porcine uterine luminal fluids: characterization and partial purification. *Biol Reprod* **1988**; 38: 551-561

Singh, B.; Rutledge, JM. y Armstrong, DT. Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. *Mol Reprod Dev* **1995**; 40: 391-399

Sirard, MA.; Dubuc, A.; Bolamba, D. Zheng, Y. y Coenen, K. Follicle-oocyte-sperm interactions *in vivo* and *in vitro* in pigs. *J Reprod Fertil* **1993**; 48 (Suppl): 3-16

Smith, LC. y Alcivar, AA. Cytoplasmic inheritance and its effect on development and performance. *J Reprod Fertil* **1993**; 48 (Suppl): 31-43

Smith, MF.; Kemper, CN.; Smith, GW.; Goetz, TL. y Jarrell, VL. Production of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 by porcine follicular and luteal cells. *J Anim Sci* **1994**; 72: 1004-1012

Smith, TT. The modulation of sperm function by the oviductal epithelium. *Biol Reprod* **1998**; 58: 1102-1104

Smith, TT. y Yanagimachi, R. Capacitation status of hamster spermatozoa in the oviduct at various times after mating. *J Reprod Fertil* **1989**; 86: 255-261

Snider, DR. y Clegg, ED. Alteration of phospholipids in porcine spermatozoa during *in vivo* uterus and oviduct incubation. *J Anim Sci* **1975**; 40: 269-274

Spindle, A. An improved culture medium for mouse blastocysts. *In Vitro J Tissue Cult Assoc* **1980**; 16: 669-674

Staigmiller, RB. y Moor, RM. Effects of follicle cells on the maturation and development competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Res* **1984**; 9: 221-229

Steeves, TE. y Gardner, DK. Temporal effects of amino acids on bovine embryo development in culture. *Biol Reprod* **1997**; 57 (Suppl 1): 25 (Abstr)

Stone, BA. Seamark, RF.; Kelly, RW. y Deam, S. Production of steroids and release of prostaglandins by spherical pig blastocysts *in vitro*. *Aust J Biol Sci* **1986**; 39: 283-294

Stroband, HWJ. y Van der Lende, T. Embryonic and uterine development during early pregnancy in pigs. *J Reprod Fertil* **1990**; 40 (Suppl): 261-277

Stroband, HWJ.; Taverne, N.; Langenfeld, K. y Barends, PMG. The ultrastructure of the uterine epithelium of the pig during the estrous cycle and early pregnancy. *Cell Tiss Res* **1986**; 246: 81-89

Stromstedt, M. y Byskov, AG. Oocyte, Mammalian. In: Encyclopedia of Reproduction. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA, **1999**; Vol 3: 468-480

Suzuki, F. Morphological aspects of sperm maturation. In: Fertilization in Mammals. Ed: BD. Bavister, J. Cummins y ERS. Roldan. Norwell, Massachusetts: Serono Symposia USA, **1990**: 65-75

Suzuki, K.; Ebihara, M.; Nagai, T.; Clarke, NGE. y Harrison, RAP. Importance of bicarbonate/CO₂ for fertilization of pig oocytes *in vitro*, and synergism with caffeine. *Reprod Fertil Dev* **1994a**; 6: 221-224

Suzuki, K.; Mori, T. y Shimizu, H. *In vitro* fertilization of porcine oocytes in chemically defined medium. *Theriogenology* **1994b**; 42: 1357-1368

Suzuki, K.; Eriksson, B. y Rodríguez-Martínez, H. Effects of hyaluronan on penetration of porcine oocytes *in vitro* by frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Theriogenology* **1999**; 51: 333 (Abstr)

Suzuki, K.; Eriksson, B.; Shimizu, H.; Nagai, T. y Rodríguez-Martínez, H. Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized *in vitro*. *Int J Androl* **2000**; 23: 13-21

Talbot, P. y DiCarlantonio, G. The oocyte-cumulus complex: Ultrastructure of the extracellular components in hamster and mice. *Gamete Res* **1984**; 10: 127-142

Tatemoto, H.; Sakurai, N. y Muto, N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of cumulus cells. *Biol Reprod* **2000**; 63: 805-810

Thibault, C. y Gerard, M. Cytoplasmic and nuclear maturation of rabbit oocytes *in vitro*. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* **1973**; 13: 145-156

Thibault, C.; Szollosi, D. y Gerard, M. Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dev* **1987**; 27: 856-896

Thibordeaux, JK.; Myers, MW. y Hansel, W. The beneficial effect of incubating bovine embryos in groups are due to platelet-derived growth factor. *Theriogenology* **1995**; 43: 336 (Abstr)

Thomassen, DG. Variable responsiveness of rat tracheal epithelial cells to bovine serum albumin in serum-free culture. *In Vitro Cell Dev Biol* **1989**; 25: 1046-1050

Thompson, JG. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology* **1996**; 45: 27-40

Thompson, JG. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. *Anim Reprod Sci* **2000**; 60-61: 263-275

- Thompson, JG.; Gardner, DK.; Pugh, PA.; McMillan, J. y Tervit, HR.** Lamb birth weight following transfer is affected by the culture system used for pre-elongation development of embryos. *Biol Reprod* **1995**; 53: 1385-1391
- Thompson, JG.; Sherman, ANM.; Allen, NW., McGowan, LT. y Tervit, HR.** Total protein synthesis within pre-elongation stage bovine embryos. *Mol Reprod Dev* **1998**; 50: 139-145
- Thompson, JG.; McNaughton, C.; Gasparinni, B.; McGowan, LT. y Tervit, HR.** Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compactation and blastulation of bovine embryos. *J Reprod Fertil* **2000**; 118: 47-55
- Tienthai, P.; Kjellen, L.; Pertoft, H.; Suzuki, K. y Rodriguez-Martinez, H.** Localization and quantitation of hyaluronan and sulfated glycosaminoglycans in the tissues and intraluminal fluid of the pig oviduct. *Reprod Fertil Dev* **2000**; 12: 173-182
- Töpfer-Petersen, E.; Calvete, JJ.; Dostálová, ZZ.; Reinert, M.; Waberski, D.; Sanz, L. y Hübner, T.** One year in the life of the spermadhesin family. *Fertilität* **1995**; 11: 233-241
- Töpfer-Petersen, E.; Petrounkina, AM. y Ekhlasi-Hundrieser, M.** Oocyte-sperm interactions. *Anim Reprod Sci* **2000**; 60-61: 653-662
- Tsafiriri, A.; Bar-Ami, S. y Lindner, HR.** Control of development of oocyte maturation in mammals. In: *Fertilization of The Human Egg In Vitro*. Ed: Beier and Lindnes. Springer-Verlag. Berlin, Germany, **1983**
- Umbreit, WW.** Carbon dioxide and bicarbonate. In: *Mamometric Techniques*. Ed: Umbreit WW, Burris RH, and Stauffer JF. Burgess Publishing Co, Mineapolis, USA, **1957**; 18-27
- Van Winkle, LJ.; Haghghat, N. y Campione, AL.** Glycine protects preimplantation mouse conceptuses from a detrimental effect on development of the inorganic ions in oviductal fluid. *J Exp Zool* **1990**; 253: 215-219
- Vijayaraghavan, S.; Critchlow, LM. y Hoskins, DD.** Evidence for a role for cellular alkalization in the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-mediated initiation of motility in bovine caput spermatozoa. *Biol Reprod* **1985**; 32: 489-500
- Visconti, PE.; Galantino-Homer, H.; Ning, X.; Moore, GD.; Valenzuela, JP.; Jorgez, CJ.; Alvarez, JG. y Kopf, S.** Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. Beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem* **1999**; 274: 3235-3242
- Walker, SK.; Heard, TM. y Seamark, RF.** *In vitro* culture of sheep embryos without co-culture: successes and perspectives. *Theriogenology* **1992**; 37: 111-126
- Walters, EM. y Graves, CN.** Transportation and storage effects on porcine ovaries. *J Anim Sci* **1998**; 76 (Suppl 2): 69 (Abstr)

- Wang, WH. y Niwa, K.** Synergetic effects of epidermal growth factor and gonadotropins on the cytoplasmic maturation of pig oocytes in a serum-free medium *Zygote* **1995**; 3: 345-350
- Wang, WH.; Niwa, K. y Okuda, K.** *In vitro* penetration of pig oocytes matured in culture by frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *J Reprod Fertil* **1991**; 93: 491-496
- Wang, WH.; Abeydeera, LR.; Okuda, K. y Niwa, K.** Penetration of porcine oocytes during maturation *in vitro* by cryopreserved ejaculated spermatozoa. *Biol Reprod* **1994**; 50: 510-515
- Wang, WH.; Abeydeera, LR.; Fraser, LR. y Niwa, K.** Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and *in vitro* fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J Reprod Fertil* **1995**; 104: 305-313
- Wang, WH.; Abeydeera, LR.; Cantley, TC. y Day, BN.** Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. *J Reprod Fertil* **1997a**; 111: 101-108
- Wang, WH.; Hosoe, M. y Shioya, Y.** Induction of cortical granule exocytosis of pig oocytes by spermatozoa during meiotic maturation. *J Reprod Fertil* **1997b**; 109: 247-255
- Wang, WH.; Abeydeera, LR.; Prather, RS. y Day, BN.** Morphologic comparison of ovulated and *in vitro*-matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after *in vitro* fertilization. *Mol Reprod Dev* **1998**; 49: 308-316
- Wang, WH.; Abeydeera, LR.; Han, YM.; Prather, RS. y Day, BN.** Morphologic evaluation and actin filament distribution in porcine embryos produced *in vitro* and *in vivo*. *Biol Reprod* **1999a**; 60: 1020-1028
- Wang, WH.; Machaty, Z.; Abeydeera, LR.; Prather, RS. y Day, BN.** Time course of cortical and zona reaction of pig oocytes upon intracellular calcium increase induced by thimerosal. *Zygote* **1999b**; 7: 79-86
- Ward, CR. y Storey, BT.** Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev Biol* **1984**; 104: 287-296
- Wassarman, PM.** The biology and chemistry of fertilization. *Science* **1987**; 235: 553-554
- Wetterman, RP. y Bazer, FW.** Influence of environmental temperature on prolificacy of pigs. *J Reprod Fertil* **1985**; 33 (Suppl): 199-208
- White, KL.; Hehnke, K.; Rickords, LF.; Southern, LL.; Thompson, DL Jr. y Wood, TC.** Early embryonic development *in vitro* by coculture with oviductal epithelial cells in pigs. *Biol Reprod* **1989**; 41: 425-430
- Whittingham, DG.** Parthenogenesis in mammals. In: *Oxford Reviews of reproductive Biology*. Ed: Finn, CA. Clarendon Press, Oxford, UK, **1980**; Vol 2: 205-231

- Wilmut, I.; Sales, DI. y Ashworth, CJ.** The influence of variation in embryo stage and maternal hormone profiles on embryo survival in farm animals. *Theriogenology* **1985**; 23: 107-119
- Wolf, DE.; Lipscomb, AC. y Maynard, VM.** Causes of nondiffusing lipid in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biochemistry* **1988**; 27: 860-865
- Wolfe, CA.; James, PS.; Mackie, AR.; Ladha, S. y Jones, R.** Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biol Reprod* **1998**; 59: 1506-1514
- Wrenzycki, C.; Herrmann, D.; Carnwath, JW. y Niemann, H.** Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol Reprod Dev* **1999**; 53: 8-18
- Xia, P.; Tekpetey, FR. y Armstrong, DT.** Effect of IGF-1 on pig Oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development *in vitro*, and on granulosa and cumulus cell biosynthetic activity. *Mol Reprod Dev* **1994**; 38: 373-379
- Xia, P.; Wang, Z.; Yang, Z.; Tan, J. y Qin, P.** Ultrastructural study of polyspermy during early embryo development in pigs, observed by scanning electron microscope and transmission electron microscope. *Cell Tissue Res* **2001**; 303: 271-275
- Xu, X.; Ding, J.; Seth, PC.; Harbison, DS. y Foxcroft, GR.** *In vitro* fertilization of *in vitro* matured pig oocytes: effects of boar and ejaculate fraction. *Theriogenology* **1996a**; 45: 745-755
- Xu, X.; Seth, PC.; Harbison, DS.; Cheung, AP. y Foxcroft, GR.** Semen dilution for assessment of boar ejaculate quality in pig IVM and IVF systems. *Theriogenology* **1996b**; 46: 13256-1337
- Xu, X.; Faillace, LS.; Harding, RT.; Foxcroft, GR. y Hunter, MG.** Evidence that Meishan and Large White hybrid preovulatory follicles may differentially affect oocyte *in vitro* maturation and fertilization. *Anim Reprod Sci* **1998**; 51: 307-319
- Yamauchi, N. y Nagai, T.** Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after *in vitro* maturation in presence of cysteamine. *Biol Reprod* **1999**; 61: 828-833
- Yamauchi, N.; Sasada, H.; Sugawara, S. y Nagai, T.** Effect of culture conditions on artificial activation of porcine oocytes matured *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* **1996**; 8: 1153-1156
- Yanagimachi, R.** Mechanisms of fertilization in mammals. In: *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*. Ed: L. Mastroianni and JD. Biggers. Plenum Press, New York, USA, **1981**
- Yanagimachi, R.** Mammalian fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*. Ed: Knobil E and Neill JD. Raven Press, New York, USA, **1988**; Vol 1: 135-185

Yanagimachi, R. Mammalian fertilization. In: The Physiology of Reproduction. Ed: Knobil E and Neill JD. Raven Press, New York, USA, **1994**; Vol 1: 189-317

Yoon, KW.; Shin, TY.; Park, JI.; Roh, S.; Lim, JM.; Lee, BC.; Hwang, WS. y Lee, ES. Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids. *Reprod Fertil Dev* **2000**; 12: 133-139

Yoshida, M. Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Mol Reprod Dev* **1993**; 35: 76-81

Yoshida, M. y Takahashi, K. Changes in glutathione and transport activity of cysteine and cystine during maturation, fertilization and development in pig ova. In: Gametes: Development and Function. Ed: Lauria, A.; Gandolfi, F.; Enne, G. and Gianaroli, L. Sero Symposia, Italy, **1998**; 621 (Abstr)

Yoshida, M.; Ishigaki, Y. y Kawagishi, H. Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *J Reprod Fertil* **1990**; 88: 1-8

Yoshida, M.; Ishigaki, Y.; Kawagishi, H.; Bamba, K. y Kojima, Y. Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes *in vitro* on subsequent fertilizing and developmental capacity *in vitro*. *J Reprod Fertil* **1992**; 95: 481-488

Yoshida, M.; Cran, DG. y Pursel, VG. Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes *Mol Reprod Dev* **1993a**; 36: 462-468

Yoshida, M.; Ishigaki, Y.; Nagai, T.; Chikyu, M. y Pursel, VG. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol Reprod* **1993b**; 49: 89-94

Yoshida, M.; Mizoguchi, Y.; Ishigaki, Y.; Kojima, T. y Nagai, T. Birth of piglets derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* **1993c**; 39: 1303-1311

Youngs, CR.; Ford, SP.; McGinnis, LK. y Anderson, LH. 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* **1993**; 71: 1561-1565

Zak, LJ.; Xu, X.; Hardin, RT. y Foxcroft, GR. Impact of different patterns of feed intake during lactation in the primiparous sow on follicular developmental and oocyte maturation. *J Reprod Fertil* **1997**; 110: 99-106

Zang, L.; Jiang, S.; Wozniak, PJ.; Yang X. y Godke, RA. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development *in vitro*. *Mol Reprod Dev* **1995**; 40: 338-344

Zhang, X. y Armstrong, DT. Presence of amino acids and insulin in a chemically defined medium improves development of 8-cell rat embryos *in vitro* and subsequent implantation *in vivo*. Biol Reprod **1990**; 42: 662-668

Zheng, YS. y Sirard, MA. The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes. Theriogenology **1992**; 37: 779-790

Zirkin, BR.; Perreault, SD. y Naish, SJ. Formation and function of pronucleus during mammalian fertilization. In: The Molecular Biology of Fertilization. Ed: Schatten H, Schatten G. Academic Press, San Diego, USA, **1989**: 91-114