

---

# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 MADURACIÓN DEL OVOCITO

### 1.1.1 MADURACIÓN *IN VIVO*

*1.1.1.1 Folliculogénesis*

*1.1.1.2 Ovogénesis*

*1.1.1.3 Ovulación*

*1.1.1.4 Transporte y maduración del ovocito*

### 1.1.2 MADURACIÓN *IN VITRO*

*1.1.2.1 Duración y condiciones de cultivo*

*1.1.2.2 Medios de cultivo y suplementos*

*1.1.2.3 Problemática actual*

*1.1.2.4 Inhibidores meióticos*

## 1.2 FECUNDACIÓN

### 1.2.1 FECUNDACIÓN *IN VIVO*

*1.2.1.1 Capacitación espermática*

*1.2.1.2 Reconocimiento y fusión de gametos*

*1.2.1.3 Activación del ovocito*

*1.2.1.4 Formación de pronúcleos y singamia*

### 1.2.2 FECUNDACIÓN *IN VITRO*

#### 1.2.2.1 INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES

*1.2.2.1.1 Concepto y aplicaciones*

*1.2.2.1.2 Antecedentes históricos*

*1.2.2.1.3 Aspectos técnicos*

*1.2.2.1.4 Fallos en la activación del ovocito*

*1.2.2.1.5 Uso de agentes activantes*

*1.2.2.1.6 Producción descendencia viva*

## 1.3 DESARROLLO EMBRIONARIO

### 1.3.1 DESARROLLO *IN VIVO*

*1.3.1.1 Segmentación o división embrionaria*

*1.3.1.2 Formación del blastocisto*

*1.3.1.3 Eclósión del blastocisto*

*1.3.1.4 Reconocimiento maternal de la gestación*

### 1.3.2 CULTIVO EMBRIONES *IN VITRO*

*1.3.2.1 Problemática actual en la especie porcina*

*1.3.2.2 Condiciones de cultivo*

*1.3.2.4 Medios de cultivo y suplementos*

*1.3.2.5 Morfología y calidad embrionaria*

*1.3.2.6 Valoración de la capacidad desarrollo embrionario*

*1.3.2.7 Transferencia de embriones*



# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## **1.1 MADURACIÓN DEL OVOCITO**

### **1.1.1 MADURACIÓN IN VIVO**

Los ovocitos son células altamente especializadas, las únicas capaces, junto con los espermatozoides, de llevar a cabo procesos meióticos y las únicas dependientes de la introducción de ADN externo, proveniente del espermatozoide para poder llevar a cabo las siguientes fases de desarrollo en condiciones *in vivo*.

Es necesario conocer con exactitud los cambios que se producen en el ovocito desde su origen embrionario hasta su transformación en una célula altamente especializada, ovocito en estadio de metafase II (MII), capaz de ser fecundada, para poder comprender los mecanismos fisiológicos relacionados con el proceso de fecundación, tanto *in vivo* como *in vitro*.

#### **1.1.1.1 Folliculogénesis**

Los ovocitos de todas las hembras de mamíferos se forman durante el desarrollo fetal. Éstos se encuentran alojados en el interior de los folículos primordiales (de cientos a miles) y abastecerán las necesidades de toda la vida reproductiva del animal. El número aproximado de folículos primordiales en la especie porcina es aproximadamente de 200.000 por ovario al nacimiento (Moor *et al.*, 1990).

Los folículos primordiales representan la unidad fundamental de desarrollo del ovario de los mamíferos. A lo largo del ciclo estral ocurren etapas sucesivas de crecimiento y regresión de folículos antrales que conducen al desarrollo de los folículos preovulatorios, constituyendo lo que denominamos dinámica folicular (Lucy *et al.*, 1992). A partir del nacimiento, de la reserva de los folículos primordiales se deriva el desarrollo o reclutamiento secuencial de grupos de folículos.

Los folículos primordiales están compuestos por un ovocito en crecimiento, rodeado por un número específico de especie de células planas pre-granulosas (Picton, 2001) que ejercen un efecto inhibitor sobre la meiosis y el crecimiento del ovocito. En la cerda, estos folículos primordiales están concentrados en una capa delgada, relativamente avascular, del córtex ovárico por debajo de la túnica albugínea. A diferencia de los folículos primordiales, los folículos en estadio más avanzado de crecimiento se encuentran siempre en la frontera córtico-medular altamente vascularizada. Se desconoce la naturaleza del factor desencadenante que transforma a un pequeño grupo de folículos primordiales en folículos primarios con crecimiento activo (Moor *et al.*, 1990), aunque sí se sabe que esta regulación es aparentemente intraovárica e insensible a las gonadotropinas (Peters *et al.*, 1993). En el interior de los folículos primarios están presentes los ovocitos, rodeados por una capa unilaminar de células pre-granulosas de morfología cúbica. Estas células presentan gran actividad mitótica y darán lugar a las células de la granulosa formando un epitelio estratificado. Entre el ovocito y las células de la granulosa circundantes se originan espacios, donde se deposita una sustancia que representa el inicio de la zona pelúcida (ZP), una cubierta extracelular glicoproteica que rodea a los ovocitos de mamíferos. La adquisición de la ZP es una característica del folículo preantral primario. Cuando se alcanza esta etapa de folículo primario, las células pre-granulosas no ejercen ningún efecto inhibitor sobre el crecimiento del ovocito pero sí sobre la meiosis (Thibault *et al.*, 1987). En este estadio, comienzan las mitosis de éstas células y al mismo tiempo el ovocito aumenta de tamaño. De este modo, el folículo primario se transforma en folículo preantral multilaminar (folículo secundario) que implica la transformación de células pre-granulosas que forman un epitelio estratificado alrededor del ovocito, llamándose células de la granulosa. Por fuera de la lámina basal, que separa las células de la granulosa del estroma, se diferencia una teca incipiente. Cuando las células de la granulosa alcanzan un número elevado como respuesta a la FSH, se forman cavidades

en el espacio extracelular llenas de un fluido denominado fluido folicular. A medida que la cantidad de líquido folicular aumenta, las cavidades que ocupan también aumentan de tamaño para formar el antro. Más tarde, con la aparición de la cavidad antral, el folículo se denomina folículo antral (folículo terciario). Tras esto, 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).

Durante la amplia etapa preantral de la foliculogénesis, el desarrollo del ovocito depende de su estrecha relación con las células de la granulosa. También durante esta fase de crecimiento se forma la zona pelúcida. La capa de células más cercana a la ZP se denomina *corona radiata*.

Mientras se produce el desarrollo folicular, se inicia una cooperación metabólica entre las células de la granulosa y el ovocito. Durante esta etapa de crecimiento se va a establecer una comunicación entre las células del *cumulus* y el ovocito, 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 entre ellas mediante estas uniones tipo *gap* (Anderson y Albertini, 1976). Este entramado de uniones intercelulares posibilita el intercambio de moléculas con el ovocito, con finalidad nutritiva y reguladora, constituyendo el proceso denominado "cooperación metabólica" (Canipari, 1994). Esta cooperación es bidireccional, ya que los ovocitos secretan diferentes factores que regulan la expansión y la esteroidogénesis (Prochazka *et al.*, 1998) del *cumulus*. Las células somáticas proporcionan nucleósidos, aminoácidos y fosfolípidos, además de mantener un balance iónico y una estabilidad en el ARNm de los ovocitos (Hunter, 2000). Conforme avanza el crecimiento folicular, las células de la teca se diferencian de las células de la granulosa y del resto de tejido del estroma que los rodea. La capa interna asume eventualmente la apariencia de las típicas células secretoras de esteroides. Durante los estadios finales del crecimiento del folículo preantral, y con más importancia del folículo antral o preovulatorio, las células de la granulosa y de la teca se diferencian y progresivamente se hacen más sensibles a la estimulación por gonadotropinas. Así, la formación de receptores funcionales de gonadotropinas en estas células, en los estadios apropiados de desarrollo

folicular (Oktay *et al.*, 1997; McNatty *et al.*, 1999) junto con el desarrollo de la función esteroidea en ambos tipos celulares, (células de la granulosa y de la teca) pueden utilizarse como marcadores funcionales del desarrollo folicular normal tanto *in vivo* como *in vitro*.

La selección de folículos, que producirán ovocitos listos para ovular en cada ciclo estral, viene determinada por la expresión de receptores de la hormona luteinizante (LH), en las células de la teca, y la hormona folículo estimulante (FSH), en las células de la granulosa (Espey, 1999). Los folículos antrales más pequeños no poseen receptores de LH en las células de la granulosa, por lo tanto no se verá reanudada la meiosis durante el pico de gonadotropinas. La FSH actúa sobre las células de la granulosa desencadenando la expresión de una batería de genes que codifican diferentes 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). Al mismo tiempo, la LH estimula las células de la teca dando lugar a la producción de andrógenos que, posteriormente se transformarán en estradiol por las células de la granulosa (Stromstedt y Byskov, 1999). Estos estrógenos sintetizados estimulan la formación de receptores de LH en las células de la granulosa.

Es importante señalar que no todos los folículos primordiales en el ovario post-natal iniciarán su crecimiento al mismo tiempo. Existen diversos factores que estimulan el inicio del crecimiento como el factor de diferenciación 9 (Growth differentiation factor GDF-9), mientras otros factores retienen a estos folículos en un estadio de reposo (Eppig, 2001). El balance entre estos factores de crecimiento debe igualmente regular la susceptibilidad a la apoptosis de los folículos tempranos (Braw-Tal, 2002).

El tiempo que tardan los folículos primordiales en convertirse en folículos preantrales es relativamente largo y varía entre las diferentes especies (Picton, 2001). En la especie porcina, la duración aproximada desde el folículo primordial hasta estadios finales preovulatorios es aproximadamente de tres meses (Morbeck *et al.*, 1992). La formación del antro es un evento tardío, que puede llevar varios meses en rumiantes y primates (Gougeon, 1996).

Uno de los puntos más difíciles de dilucidar en la fisiología del ovario son los factores que determinan que los folículos permanezcan senescentes, que entren en desarrollo y en proceso de atresia (muerte folicular), mientras un tercer grupo madura y es ovulado.

Existen dos eventos importantes durante la foliculogénesis, el *reclutamiento inicial* y el *reclutamiento cíclico*. El primero se da de una forma continua y empieza en el preciso momento en que se han formado los folículos, mucho antes de la pubertad, y es el responsable de que los folículos primordiales salgan de su estado de reposo y comiencen una etapa de crecimiento. Durante el *reclutamiento inicial*, factores intraováricos u otros factores desconocidos, estimulan a un grupo de folículos primordiales a iniciar el crecimiento, mientras el resto permanece senescente durante meses o años. Este proceso podría deberse a la liberación de estímulos inhibitorios que hasta ese momento mantenían a los folículos en reposo (McGee y Hsueh, 2000). El *reclutamiento cíclico* comienza después de la llegada a la pubertad, como resultado de un aumento en los niveles de FSH circulante durante los ciclos reproductivos. Esto permite que una cohorte de folículos en fase antral sea rescatada del proceso de atresia. En este momento, los folículos han completado su crecimiento y los ovocitos adquirido la zona pelúcida y se encuentran competentes para reanudar la meiosis. De este modo, sólo un número de folículos sobrevivirá, mientras que el resto entrará en atresia.

### **1.1.1.2 Ovogénesis**

#### *1.1.1.2.1 Crecimiento del ovocito*

Los ovocitos presentes en el ovario se originan a partir de un número de células germinales primordiales (CGP) que derivan del endodermo del embrión en desarrollo; posteriormente emigran hasta el mesenterio y se exteriorizan en las crestas genitales. Estas células son grandes y poseen un núcleo redondo con uno o varios nucleolos; además, en su citoplasma están presentes pequeñas mitocondrias, túbulos y cisternas del retículo endoplasmático, polirribosomas, complejos de Golgi, microfilamentos, y un número variable de partículas de glucógeno y gotas lipídicas (Picton, 2001). Las partículas de glucógeno y las gotas lipídicas almacenadas en estas CGP servirán de reserva energética durante la migración hasta las crestas genitales. Inicialmente, el transporte de estas CGP hacia el presunto ovario

depende de una transferencia pasiva que ocurre como consecuencia de los cambios que se están produciendo en el embrión en desarrollo. Posteriormente, este transporte es dependiente del movimiento morfogénico y de propulsión de estas células con alta motilidad como respuesta a determinadas sustancias quimiotácticas, como el factor de transformación del crecimiento (TGF $\beta$ 1). Una vez establecidas en el ovario primordial, estas células pierden su motilidad y son transformadas en ovogonias, las cuales comienzan a dividirse por sucesivas mitosis, hasta que la última generación de ovogonias entra en meiosis dando lugar a los ovocitos primarios.

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 de dictiatio) caracterizado por la presencia de un núcleo prominente que recibe el nombre de vesícula germinal (GV). Los ovocitos en estadio de diplotene son más grandes que las ovogonias, y poseen mayor cantidad de organelas citoplasmáticas. Este ovocito se encuentra en el equivalente estadio mitótico G2 ya que el ADN se ha replicado antes de comenzar la meiosis. En esta etapa, la meiosis del ovocito se encuentra inhibida. La detención meiótica se mantiene por un sistema de múltiple control donde intervienen el AMPc (Schultz, 1991; Mattioli 1994) y otros factores (Thibault *et al.*, 1987). Este estadio no presenta cambios hasta que los folículos dominantes son estimulados por el pico de gonadotropinas. La mayoría de los ovocitos suele haber llegado a este estadio en la fase final de la vida fetal del individuo.

El inicio del crecimiento lleva asociado una expresión coordinada de genes específicos del ovocito, como ZPA, ZPB, ZPC, mediante los cuales tendrá lugar la formación de la ZP (Miller, 1999). Esta estructura proporciona una superficie protectora al ovocito impidiendo el paso de sustancias con peso molecular mayor de 170kDa. Los estudios realizados sobre el proceso de formación de la ZP no son del todo claros y generan bastante polémica. En referencia al trabajo realizado por Sinowatz *et al.*, en 2001 existen tres teorías; una primera que describe que el ovocito es el único participante en la síntesis de las glicoproteínas de la ZP, otra en la que las responsables de la síntesis son las células foliculares y la última en la que las células foliculares conjuntamente con el ovocito se encargan de su formación. La ZP está formada por tres clases de glicoproteínas

denominadas ZP1, ZP2 y ZP3, que en la especie porcina se conocen como ZP3 $\alpha$ , ZP1 y ZP3 $\beta$ , respectivamente (Miller, 1999), y se combinan para formar una capa de alrededor de 15 $\mu$ m de grosor rodeando al ovocito (Cohen *et al.*, 1992). Aunque los tres componentes de la zona juegan un papel importante en el mantenimiento de la estructura de la ZP, están altamente diferenciados en relación a su papel biológico. La ZP1, en el caso del ratón, actúa como nexo de unión entre los filamentos de la ZP2 y la ZP3. Esta última, se ha demostrado que actúa como receptor primario de reconocimiento espermático en esta especie. La unión entre la cabeza espermática y la ZP3 da lugar a la inducción de la reacción acrosómica (Wassarman, 1988). Después de producirse la reacción acrosómica, la ZP2 actúa como receptor secundario de reconocimiento facilitando la penetración del espermatozoide reaccionado a través de la zona. No obstante, existen diferencias entre especies en cuanto al papel fisiológico de las distintas glicoproteínas, y quedan actualmente numerosos aspectos por investigar.

Los ovocitos bovinos y porcinos crecen desde un diámetro de 30 $\mu$ m (sin incluir ZP) en estadios tempranos de crecimiento hasta un diámetro aproximado de 120-125 $\mu$ m (Hyttel *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 1998).

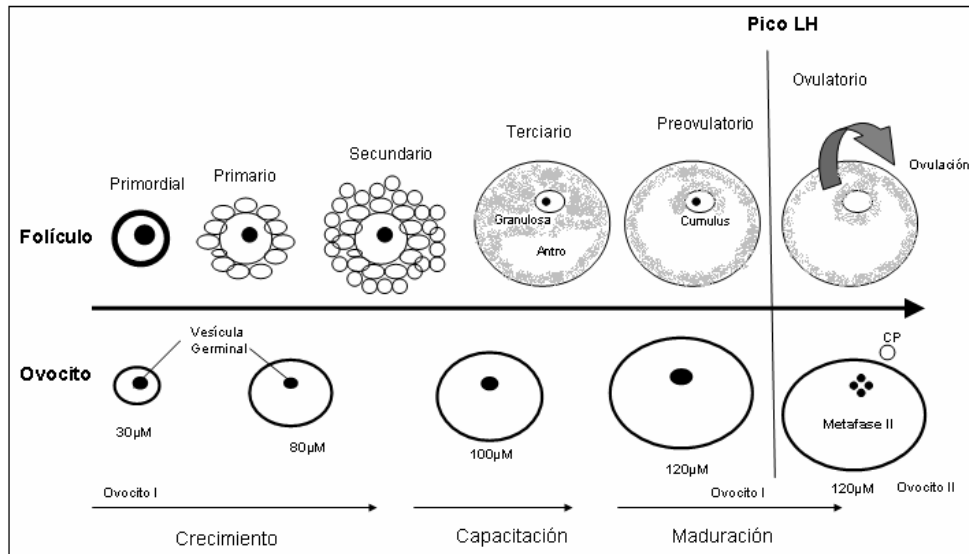
#### 1.1.1.2.2 Maduración del ovocito

Durante la maduración del ovocito, se producen una compleja serie de modificaciones en el citoplasma, junto con la maduración meiótica del núcleo y ciertos cambios en la membrana, con el fin de preparar a este ovocito para ser fecundado con éxito y poder mantener la primera fase de desarrollo embrionario.

En la figura 1 se representan las diferentes fases del crecimiento, capacitación y maduración durante la foliculogénesis del ovocito según Mermillod *et al.* (1999).



FIGURA 1. Representación esquemática del crecimiento del ovocito, capacitación y maduración durante la foliculogénesis (Mermillod *et al.*, 1999).



#### a) Maduración citoplasmática

Los cambios que acontecen en el paso de ovocito primordial hasta embrión transcricionalmente activo se pueden dividir en tres:

- Programa de crecimiento único o **capacitación ovocitaria**, que es el proceso de preparación del ovocito durante la foliculogénesis que posibilita un desarrollo embrionario posterior (Hyttel *et al.*, 1997; Moor *et al.*, 1998). En este periodo sólo se dividen las células somáticas, no el ovocito. Representa un período de síntesis intensa y almacenamiento de macromoléculas. El ovocito durante esta etapa es incapaz de pasar del estadio del ciclo celular G2 a metafase. Las células foliculares proporcionan soporte metabólico e instruccional para que el ovocito no cambie de fase dentro del ciclo celular.

Los ovocitos que se encuentran dentro de los folículos primordiales son metabólicamente activos. Estos ovocitos responden a las señales de

crecimiento intraováricas y comienzan una fase de síntesis activa. Esta fase de crecimiento es única y difiere de las células somáticas en tres aspectos importantes. En primer lugar, a pesar de que el ovocito aumente su tamaño, este proceso tiene lugar en ausencia completa de división celular. Por otra parte, gran parte de los productos procedentes de la transcripción y traducción no se utilizan durante esta fase de crecimiento activo, pero se almacenan para posterior uso durante la embriogénesis temprana. Por último, la regulación del crecimiento y ciclo celular del ovocito está mediada por una serie de complejas interacciones con las células somáticas que rodean al ovocito. Durante el estadio de folículo primordial, las células que rodean al ovocito probablemente ejercen una influencia negativa en el crecimiento del ovocito. Este efecto negativo desaparece cuando estas células son estimuladas por mecanismos desconocidos y entran en mitosis (Thibault *et al.*, 1987). Por lo tanto, esta cooperación metabólica mediada por el soporte celular es importante para el crecimiento del ovocito.

- **Modificaciones bioquímicas y morfológicas** del ovocito durante la maduración que son desencadenadas por el **pico de LH**. La maduración ovocitaria está desencadenada por la respuesta folicular al pico preovulatorio de gonadotropinas, que confiere al ovocito la capacidad de sostener la fecundación y el desarrollo embrionario temprano. Durante esta fase de maduración, las células de la granulosa siguen produciendo esteroides, pero tiene lugar el paso de un ambiente estrogénico a otro donde predomina la progesterona. Por otra parte, producen ácido hialurónico que permite la expansión y mucificación de las células del *cumulus* y pérdida de las uniones tipo *gap* de contacto entre el ovocito y estas células. El potencial para la maduración nuclear y citoplasmática se adquiere conjuntamente durante el desarrollo del ovocito (Moor *et al.*, 1998; Picton *et al.*, 1998).

Las interacciones entre las células foliculares y el ovocito son cruciales para el inicio y finalización de esta fase de diferenciación o maduración. Cuando la asociación entre las células foliculares y el ovocito se pierde, aumenta el transporte de membrana y se produce una resituación de organelas citoplasmáticas. Algo del ARNm almacenado durante la fase de crecimiento empieza a transcribirse y las proteínas resultantes juegan un papel crítico en la progresión del ciclo meiótico, en la regulación de la penetración del espermatozoide y en su posterior descondensación.

Por otra parte, durante este estadio de diferenciación, las mitocondrias uniformemente distribuidas en el citoplasma de ovocitos en estadio de GV, se agregan alrededor del núcleo, momento que coincide con la rotura de la vesícula germinal (Thibault *et al.*, 1987). Este agrupamiento mitocondrial y posterior dispersión en estadio de anafase/telofase es microtúbulo dependiente y necesario para la progresión de la maduración.

Mientras que las mitocondrias migran para alcanzar una posición perinuclear durante el periodo de maduración, los gránulos corticales (GC) migran hacia la membrana celular formando una monocapa irregular (Cran y Cheng, 1986). A menudo se forma una zona desprovista de organelas cerca de esta monocapa de gránulos corticales, mientras que una delgada capa de filamentos de actina se interpone entre los GC y el oolema.

Los GC representan una forma especial de lisosomas primarios esféricos, limitados por una membrana, con un tamaño variable y compuestos por glicoproteínas y enzimas hidrolíticas. Se originan a partir del aparato de Golgi y el retículo endoplásmico rugoso, y se forman durante el crecimiento folicular mediante un crecimiento continuo hasta que se produce la ovulación.

Ha sido demostrado que la migración de los GC es un evento necesario para el bloqueo a la polispermia. El desarrollo de la capa de filamentos de actina está probablemente relacionado con la estabilización de los GC, además de ser importantes para su exocitosis. Todavía no está del todo claro por qué una zona desprovista de organelas se forma cerca de esta capa de GC en los ovocitos porcinos. Los ribosomas aumentan en número y el aparato de Golgi se alarga y se transforma en cisternas dilatadas situadas en el córtex del ovocito donde será activo en la exportación de glicoproteínas a la ZP (Picton, 1998) y en la formación de GC necesarios en la fecundación. El retículo endoplasmático también adquiere posición cortical, donde llevará a cabo la liberación de calcio para que se produzca la exocitosis de los GC. También durante la maduración citoplasmática se produce un aumento en la acumulación de lípidos y glutatión (Rodríguez y Farin, 2004).

La remodelación citológica está acompañada de una maduración molecular con síntesis y almacenamiento de una amplia variedad de proteínas durante el crecimiento del ovocito. Se ha visto que esta

maduración molecular ocurre unas pocas horas antes de la recogida de ovocitos (en hembras sincronizadas hormonalmente) (Sirard *et al.*, 2003). Se sabe que el ARNm es la forma principal de almacenamiento de información en los ovocitos y éste permanece estable durante días (Brower *et al.*, 1981). Durante esta reprogramación, tiene lugar al mismo tiempo nueva síntesis y cese de síntesis de ciertas proteínas específicas del estadio de GV. Estas nuevas proteínas sintetizadas juegan un papel importante en la progresión del ciclo meiótico hasta su finalización, con la formación del pronúcleo femenino.

La clave en la maduración y viabilidad embrionaria reside en el compartimento folicular más que en el propio ovocito. Fallos en la adquisición de estas sustancias no permitirán al ovocito adquirir los nutrientes y señales necesarias para el desarrollo embrionario posterior.

- Como consecuencia de la reorganización y utilización de los productos formados durante las dos fases anteriores, el ovocito crece, finaliza el control materno del desarrollo y se **activa el genoma embrionario**. Durante esta fase se produce una nueva transcripción embrionaria (Sirard, 2001). En el ratón, se ha visto que el genoma embrionario toma el control del desarrollo temprano inmediatamente después de la fecundación, en el estadio de dos células, mientras que en grandes animales, esta transición ocurre unos ciclos celulares posteriores (Bachvarova, 1985). El ovocito contiene las instrucciones apropiadas para llevar a cabo las primeras divisiones. Esta transición se denomina transición maternal a cigoto (*maternal to zygotic transition*, MZT) y requiere la traducción de nuevas proteínas (Sirard, 2001).

La reorganización y utilización de los productos almacenados durante el crecimiento del ovocito constituye una pieza clave del programa de maduración. Estos eventos de diferenciación no son dependientes de la regulación nuclear; sin embargo, controlan la progresión del ciclo meiótico y otros eventos intracelulares que confieren al ovocito la competencia para el desarrollo posterior. Estos cambios tienen lugar en los diferentes componentes del ovocito y están facilitados o regulados por las células somáticas del folículo.

No existen métodos para diferenciar ovocitos competentes o incompetentes, excepto por cambios en la morfología del nucleolo asociados

al proceso de la capacitación ovocitaria (Hyttel *et al.*, 1997). Únicamente se puede valorar esta competencia mediante la tecnología de la fecundación *in vitro* y transferencia embrionaria (Sirard *et al.*, 2003).

#### b) Maduración Nuclear

La meiosis es un tipo de división celular característico de las células germinales (espermatogonias y ovogonias). Su objetivo es doble: la reducción de un número diploide de cromosomas a un número haploide y la recombinación de la información genética (Polanski y Kúbiak, 1999). Es importante el estudio detallado de estos procesos que tienen lugar en el interior del ovocito para posteriormente, comprender el mecanismo que tiene lugar durante la fecundación.

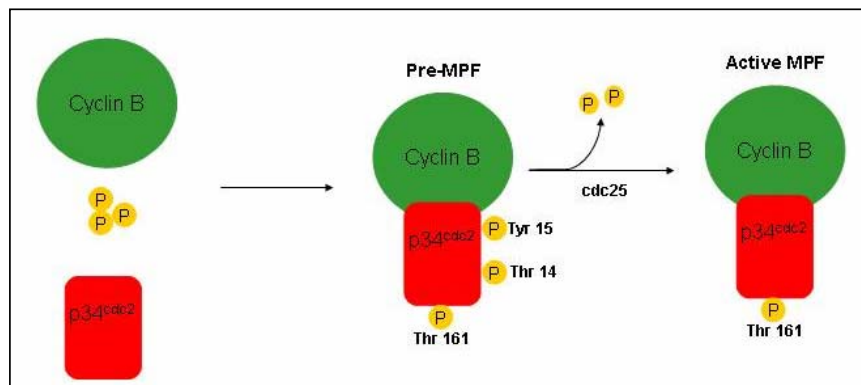
En la especie porcina, los folículos menores de 0.7mm de diámetro contienen ovocitos incapaces de reanudar la meiosis (Hunter, 2000). La capacidad de desarrollo se incrementa conforme va aumentando el diámetro del folículo (Hunter, 2000).

Los ovocitos de la mayoría de mamíferos se encuentran en estadio de diplotene de la profase I, hasta que se produce la adecuada estimulación de factores de crecimiento y hormonales dando lugar a la progresión de estos ovocitos al estadio de MII. Posteriormente, éstos quedarán en este estadio de MII hasta que se produzca la fecundación.

Los ovocitos porcinos necesitan de un periodo de síntesis proteica (al que nos hemos referido previamente durante la maduración citoplasmática), anterior a la rotura de la vesícula germinal (GVBD), para una progresión normal en el ciclo meiótico (Fulka *et al.*, 1986). La inhibición de la síntesis proteica en diferentes estadios posteriores a la inducción de la maduración en ovocitos porcinos demuestra que las proteínas necesarias para la progresión del ciclo celular son sintetizadas en suficiente cantidad para que tenga lugar la GVBD a las 12-16h después del pico de LH. Sin embargo, la nueva síntesis proteica no se requiere para la condensación cromatínica o desaparición del nucleolo, pero sí es absolutamente necesaria para la rotura de la membrana nuclear (Kubelka *et al.*, 1988).

⇒ Adquisición de la competencia meiótica; la adquisición de la capacidad meiótica está asociada con la aparición de componentes esenciales del ciclo celular como el factor promotor de la metafase (MPF, Masui y Market, 1971), una quinasa que se activa en ovocitos completamente desarrollados entre las 8 y 12h después de la inducción de la maduración. El MPF (figura 2) se constituye gracias al ensamblaje de una subunidad reguladora (Ciclina B) y una subunidad catalítica. Esta última es una proteína de 34-kDa denominada p34<sup>cdc2</sup>, en la que se lleva a cabo la transferencia de grupos fosfatos del ATP a residuos específicos de serina y treonina, y otra. Esta quinasa es una de las quinasas principales en la regulación de la transición de la fase G2/M durante la mitosis, así como en la meiosis ovocitaria. Los ovocitos porcinos en crecimiento ( $\leq 90 \mu\text{m}$  de diámetro) son incapaces de reanudar la meiosis *in vitro*. Esta incapacidad para reanudar la meiosis no viene dada por una deficiencia en el MPF y/o proteínquinasas activadoras de la mitosis (MAP quinasas), ya que la cantidad de las dos subunidades de MPF, p34<sup>cdc2</sup> y la ciclina B en ovocitos en crecimiento es comparable a la existente en ovocitos totalmente desarrollados. Pero estos ovocitos contienen la forma fosforilada de la p34<sup>cdc2</sup>, que no permite la activación del MPF hasta que no completen su crecimiento (Christmann *et al.*, 1994). Posteriormente, cuando los folículos alcanzan un diámetro de 1.0-1.5mm, los ovocitos que han reanudado la meiosis y se encuentran en estadio de MI, son capaces de activar la subunidad catalítica (cdc2), pero todavía no han establecido una vía MAP quinasa-activadora por lo que no son capaces de proseguir la maduración hasta estadio de MII (Motlik *et al.*, 1984). Por lo tanto, se sabe que la adquisición de la competencia meiótica en ovocitos porcinos se correlaciona con la capacidad para activar a estas dos proteínas, MPF y MAP-quinasas (Kanayama *et al.*, 2002). En primer lugar adquieren la capacidad de activar la subunidad cdc2 y posteriormente la adquieren para activar la vía MAP quinasa durante la fase de crecimiento.

FIGURA 2. Representación esquemática del MPF con sus dos subunidades.



⇒ *Reanudación de la meiosis*; en la especie porcina la capacidad para reanudar la meiosis se adquiere cuando los folículos alcanzan un diámetro de 3mm o más (Marchal *et al.*, 2002).

Se han estudiado diversas moléculas que regulan el proceso meiótico, y entre ellas se encuentran:

- **Adenosínmonofosfato cíclico (AMPc)**: La reanudación de la meiosis viene precedida por un aumento en el AMPc. Los niveles basales de AMPc producidos por las células somáticas en los folículos son transferidos de una manera continuada al ovocito a través de las uniones tipo *gap*; de esta manera, se mantiene el ovocito en el arresto meiótico. Posteriormente, a partir de la formación de receptores de la LH, las células de la granulosa y del *cumulus* responden al pico preovulatorio produciendo grandes cantidades de AMPc. Estas elevadas concentraciones de LH median en la acción de la **conexina 43**, proteína que forma parte de las uniones tipo *gap* de las células foliculares. Se producen cambios en la conformación de esta conexina, vía proteínquinasa C (PKC) y/o vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (**PI 3-Kinase**). La activación de esta última quinasa provoca en las células del *cumulus* la fosforilación de la conexina 43 produciéndose una reducción de las comunicaciones intercelulares en dichos folículos y por lo tanto en la cooperación metabólica (Gilula *et al.*, 1978). Este proceso es conocido como expansión o mucificación del *cumulus* (Eppig, 1979) y se produce a las 16h posteriores al pico preovulatorio de gonadotropinas. Por otra parte, la activación de esta PI 3-quinasa en las células del *cumulus*

contribuye a la activación de las MAP quinasas y MPF (Shimada y Terada, 2001). Bajo estas condiciones, el flujo de AMPc desciende por debajo del umbral requerido para inhibir la activación de MPF y el ovocito reanuda la meiosis (Dekel, 1999).

- **MPF**: El proceso de reanudación de la meiosis está controlado a través de la activación mediante una vía de señal transductora que incluye el MPF. Este factor se activa durante el comienzo de la maduración ovocitaria, al iniciarse la GVBD y aumenta en estadio de MI; posteriormente, su actividad decae en estadio de anafase/telofase I y vuelve a alcanzar un pico en estadio de MII (Wu *et al.*, 1997).

La activación de este factor viene inducida por la defosforilación de la tirosina de la subunidad catalítica p34<sup>cdc2</sup> y síntesis de la ciclina B. En ovocitos porcinos completamente desarrollados, está presente el complejo asociado de ambas subunidades (Chen *et al.*, 2000), pero el aumento de la forma activa del MPF hasta concentraciones efectivas requiere síntesis proteica activa (Motlik y Kubelka, 1990).

- Junto con el MPF participan otras quinasas reguladoras de la señal extracelular (**ERK**) que intervienen en la maduración del ovocito en diferentes especies (Inoue *et al.*, 1995). Se ha descrito la expresión de dos isoformas no fosforiladas de ERK en ovocitos mamíferos inmaduros; ERK1 (44kDa) y ERK2 (42kDa). Ambas se vuelven activas mediante su fosforilación durante el período de la rotura de la vesícula germinal (GVBD). Estas dos isoformas pertenecen a la superfamilia de las proteínquinas activadoras de la mitosis **MAP quinasas**, entre las cuales también destacan la MAPK p38 y la c-Jun N- terminal quinasas (**JNK**, también conocidas como proteínquinas por estrés). Todas ellas son proteínquinas serina-treonina. Recientemente se ha estudiado la MAPK p38 en ovocitos porcinos demostrándose que esta proteína se activa durante la GVBD, permaneciendo en este estado activo durante la progresión de MI a MII. También se ha descubierto la presencia de esta proteína en las células del *cumulus* participando en la expansión de éste inducida por la FSH. La inhibición de esta proteína bloquea la reanudación de la meiosis inducida por FSH en ovocitos con *cumulus* y bloquea la transición de MI-MII en ovocitos desnudos (Villa-Díaz y Miyano, 2004).



- **PKC** (proteínquinasa C): Diferentes estudios muestran la existencia de diversas isoformas de las PKC que se concentran en el estadio de GVBD de ovocitos porcinos (Fan *et al.*, 2003). Shimada y Terada en 2001 observaron que la reanudación de la meiosis de los ovocitos porcinos estaba asociada con la vía de la PKC en las células del *cumulus*.

La maduración meiótica del ovocito conlleva la capacidad para la rotura de la membrana nuclear, y posterior progresión del ovocito de la fase G2 del ciclo celular de estadio de diplotene de la profase de la primera división meiótica hasta MII.

Resumiendo, la reanudación de la meiosis puede explicarse mediante una reducción en la concentración de AMPc y la consiguiente activación-inactivación de proteínas presentes en el ooplasma (Fulka *et al.*, 1998; Moor *et al.*, 1998; Picton *et al.*, 1998).

Se ha demostrado mediante detallados análisis citológicos de los eventos meióticos que tienen lugar durante la maduración, que los cambios en la cromatina nuclear ocurren en la fase folicular antes del pico de LH (Daguet, 1980). Durante la fase de GV0, la cromatina dispersa, característica de los ovocitos en la fase luteal, inicia una parcial condensación con agregados de cromatina irregulares alrededor del núcleo frente a la membrana nuclear (GV1). Según los estudios realizados por Motlik y Fulka (1986), los intervalos que se suceden desde la liberación de LH hasta la rotura de la vesícula germinal, tienen una duración aproximada de 20-24h y pueden dividirse en cuatro fases bien diferenciadas. Sobre las 8-10h posteriores a la exposición de LH, unos pocos agregados de cromatina se forman alrededor de la membrana nuclear (GV2), y a las 16h la mayoría de los ovocitos exhiben puntos de cromatina condensada y el comienzo de la formación de hebras (GV3). En la fase final, a las 20-24h después de LH, el nucleolo desaparece, la cromatina se condensa formando una red de bivalentes individuales y se produce la rotura de la membrana nuclear (GVBD).

Se han estado realizando diferentes estudios de fusión celular para comprender la relación entre el núcleo y el citoplasma durante el período anterior a la GVBD (Fulka *et al.*, 1986; Motlik y Fulka, 1986; Kubelka *et al.*, 1988). Estos estudios sugieren que los factores relacionados con la maduración (MPF *like factors*), alcanzan sus máximos niveles en los

ovocitos a las 8-16h después de la inducción de la maduración. Estos factores requieren la síntesis proteica para su activación o acumulación. Parece ser que la actividad de condensación cromosómica en los ovocitos porcinos está posiblemente localizada en el nucleoplasma, y no se libera al ooplasma hasta después de la rotura de la membrana nuclear.

La capacidad de progresión del estadio de vesícula germinal a estadio de MII, junto con la compactación nuclear y con el cese de la síntesis de ARN, ocurre cuando los ovocitos alcanzan su tamaño completo en el folículo antral. Más del 80% de los ovocitos de 100 $\mu$ m de diámetro (80% del tamaño completo) permanecen bloqueados en estadio de GV después de 24h de cultivo, mientras que todos los ovocitos totalmente desarrollados completan la rotura de la vesícula germinal (GVBD) durante el mismo periodo *in vitro* (Motlik *et al.*, 1984).

La capacidad para completar la transición de G2 a prometafase coincide con el cese de la actividad transcripcional del nucleolo, con la adquisición del tamaño completo y con la capacidad de sintetizar las proteínas propias del estadio de metafase (McGaughey *et al.*, 1979).

⇒ Ensamblaje del aparato meiótico; existen diversas proteínas asociadas en este proceso como la **MAPquinasa** y la **p90<sup>rsk</sup>** que se encuentran siempre en áreas donde hay ensamblaje de microtúbulos (Lee *et al.*, 2000). Por otra parte se han descrito la **NuMA** y la **gamma-tubulina**; ambas se han visto asociadas en áreas cercanas a los cromosomas. NuMA ha sido observada en ambos polos del huso mitótico durante la MI, mientras que la gamma-tubulina se localiza entre el huso de microtúbulos (Sun *et al.*, 2001). Otras proteínas asociadas a este aparato meiótico son la *Polo-like* quinasa 1 (Yao *et al.*, 2003) y la CENP-E, una proteína motora de los cinetocoros (Lee *et al.*, 2000).

⇒ Detención en Metafase II; los ovocitos en estadio de MII presentan elevados niveles de MPF y actividad MAP quinasa; se ha estudiado que estos factores actúan como factores citostáticos (CSF, *cytostatic factors*) que mantienen a los ovocitos de los vertebrados, incluyendo los mamíferos en arresto meiótico. El MPF se conoce como un componente importante de los CFS en los ovocitos porcinos; este factor alcanza uno de sus máximos en estadio de MII, por lo que la habilidad de estos ovocitos para activarse depende de la disminución de la actividad de este factor (Kikuchi *et al.*,

2000). Además, la transición de estadio MII hacia anafaseII/telofaseII depende de la inactivación del MPF y degradación de la ciclina B (Miyano *et al.*, 2000).

Recientes estudios sugieren que las MAP quinasa y la p90<sup>rsk</sup> juegan un papel importante en la detención de ovocitos porcinos en estadio de MII (Fan *et al.*, 2003).

### **1.1.1.3 Ovulación**

El pico preovulatorio de LH, inducido por adecuados niveles de estradiol producido por los folículos preovulatorios, desencadena finalmente la ovulación.

En la especie porcina, la ovulación suele tener lugar 36-40h 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, el inicio y la duración de la ovulación son muy variables (revisado por Flowers y Esbenshade, 1993). Los folículos que alcanzan un diámetro de 3-5 mm se consideran capacitados para ovular. Las paredes de estos folículos no están tensas, sino que se produce un descenso de la presión intrafolicular como consecuencia de alguna variación en sus propiedades (Hunter, 1967). De esta manera, en la cerda, la ovulación se produce por un ablandamiento y colapso provocada por la disociación enzimática de la pared folicular (Hunter, 1988), por ejemplo, por las colagenasas que disuelven la membrana basal y el estroma folicular durante la ovulación.

Los ovocitos se liberan del folículo preovulatorio o folículo de Graff como ovocitos secundarios en estadio de MII, revestidos por un número variable de células del *cumulus* y por líquido folicular viscoso. El número de ovocitos liberados es variable, oscilando entre 10 y 24 (Geisert, 1999).

### **1.1.1.4 Transporte del ovocito en el oviducto**

El oviducto de los mamíferos proporciona el microambiente necesario para la captura, transporte y maduración final de los ovocitos ovulados; transporte, almacenamiento y capacitación de los espermatozoides; la

fecundación, y por último, las primeras divisiones del embrión (Hunter, 1988).

En el momento de la ovulación, la fimbria del oviducto envuelve al ovario, capturando el contenido de los folículos, es decir, los ovocitos rodeados por sus células del *cumulus oophorus* y una pequeña cantidad de fluido folicular viscoso. Estos ovocitos se disponen en la ampolla oviductal a través de la cual son transportados hacia el lugar de fecundación, en la unión ampular ístmica. Todo el proceso descrito dura unos 24-30 minutos (Hunter, 1989) y posteriormente, los cigotos migran o son transportados hacia el útero.

Al transporte de los ovocitos contribuyen las ondas de contracción peristáltica en el miosálpinx, el batido ad-ovárico de los cilios que revisten la ampolla y los movimientos del mesosálpinx (Hunter, 1989). Durante la citada fase de transporte se produce una maduración final del ovocito secundario y, efectivamente, podría preverse algún tipo de cambio de membrana teniendo en cuenta la diferencia entre los "medio ambientes" folicular y tubárico (Hunter, 1989). La adhesión de glicoproteínas oviductales (oviductinas) a la ZP es quizás uno de los cambios mas importantes (Hunter, 1989).

En el caso de la cerda, los ovocitos empiezan a degenerar a las 8 horas postovulación aunque el animal puede seguir presentando conducta típica de celo y ser receptivo al macho. Los ovocitos no fecundados degeneran en el útero por reblandecimiento y distorsión de la zona pelúcida (Hunter, 1982).

### **1.1.2 MADURACIÓN IN VITRO (MIV)**

Las secuencias detalladas de los eventos que ocurren durante el crecimiento del ovocito *in vivo* deben imitarse lo máximo posible, mediante técnicas diseñadas para soportar el crecimiento folicular y ovocitario *in vitro*.

### 1.1.2.1 Duración y condiciones de cultivo

El tiempo de cultivo necesario para obtener ovocitos madurados *in vitro* en el estadio nuclear de MII es bastante aproximado al requerido *in vivo*. La duración del cultivo durante la MIV de los ovocitos porcinos oscila desde 36h (Yoshida *et al.*, 1993; Ka *et al.*, 1997) hasta 48h (Naito *et al.*, 1988), pasando por 40h (Funahashi y Day, 1993), 44h (Galeati *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1997; Rath *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1997), 46h (Eng *et al.*, 1986; Kikuchi *et al.*, 1993) o incluso 50h (Kim *et al.*, 1998). Según Ka *et al.* (1997) un cultivo de 36h 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 42-44h. Recientemente, otros autores apuntan a la necesidad de reducir los tiempos de maduración para conseguir una mejor calidad ovocitaria, ya que se ha observado que los ovocitos más viejos tienen menor capacidad de ser fecundados que los jóvenes, debido a la menor cantidad de quinasa H1 (Stumpf *et al.*, 1994) y a la menor cantidad de la forma activada del MPF (Kikuchi *et al.*, 2000).

Las condiciones físicas específicas del ambiente en el que maduran los ovocitos (osmolaridad, pH y composición iónica del medio, temperatura y tensión de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> 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 el resultado final (Holm y Callesen, 1998).

La temperatura de incubación más utilizada, tanto en la MIV como en la fecundación *in vitro* (FIV) y el cultivo de embriones (CE) se encuentra cercana a la temperatura corporal de la cerda que es de 39°C. Se han realizado diversas investigaciones a temperaturas de 37°C (Naito *et al.*, 1988) pero la temperatura más utilizada es de 38.5°C (Yoshida *et al.*, 1992, 1993; Liu *et al.*, 1997) o de 39°C (Galeati *et al.*, 1991; Zheng y Sirard, 1992; Rath *et al.*, 1995; Sawai *et al.*, 1997). La atmósfera de cultivo empleada como rutina en los protocolos de producción de embriones porcinos es de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Normalmente, los cultivos *in vitro* utilizan medios ricos en bicarbonato sódico para mantener el pH adecuado.

### 1.1.2.2 Medios de cultivo y suplementos

Para la maduración *in vitro* de los ovocitos porcinos, se han estado empleando diferentes medios de cultivo dependiendo del propósito de estudio o del grupo de trabajo. Los medios se pueden clasificar en sencillos o complejos en función de la diversidad de componentes. Entre los medios de cultivo **sencillos** ampliamente utilizados en la MIV porcina se encuentra el medio *Whitten's* (Funahashi *et al.*, 1994; Coy *et al.*, 1996; Ka *et al.*, 1997) el medio KRB (Krebs Ringer Bicarbonato; Naito *et al.*, 1988) y el medio NCSU (*North Carolina State University*; Abeydeera *et al.*, 1998). Estos medios se suelen preparar en el propio laboratorio. Dentro de los medios de MIV **complejos** podemos destacar el TCM199 (*Tissue Culture Medium* 199; Zheng y Sirard, 1992; Rath *et al.*, 1995; Coy *et al.*, 1999) y el *Waymouth* (Yoshida *et al.*, 1993, Kikuchi *et al.*, 1999; Coy *et al.*, 1999). Éstos, a diferencia de los anteriores, se suelen adquirir en preparados comerciales debido a su elevado número de componentes.

A su vez, los medios de cultivo se dividen en definidos o indefinidos, conforme el tipo de suplementación que presenten. La tendencia actual es, en la medida de lo posible, el uso de medios con suplementos definidos. De esta manera, no se presentan posibles factores desconocidos que podrían interferir en la regulación de los procesos de estudio (Abeydeera, 2002).

Los suplementos varían de igual forma dependiendo del objetivo de la investigación y de los laboratorios. Se sabe que durante el proceso de MIV en muchas especies intervienen mayoritariamente la suplementación de proteínas y de hormonas.

Dentro de los suplementos más utilizados se encuentran:

- Fluido folicular porcino (**PFF**). Es el fluido fisiológico que llena el antro folicular y baña al ovocito en condiciones *in vivo*. Su empleo está extendido entre numerosos autores (Yoshida *et al.*, 1993; Rath *et al.*, 1995; Coy *et al.*, 2002, Matás *et al.*, 2003). Yoshida *et al.* (1992) demostraron que el fluido folicular contenía una sustancia ácida que promovía la maduración ovocitaria. El PFF procedente de folículos de 3 a 6mm de diámetro aporta al medio de cultivo no sólo proteínas sino también una cantidad basal de gonadotropinas y estradiol (Funahashi y Day, 1993). Se ha probado que su adición al medio aumenta los porcentajes de maduración

nuclear (Yoshida *et al.*, 1992), promueve significativamente la formación del pronúcleo masculino y la expansión de las células del *cumulus*.

- Suero fetal bovino (**FCS**) y albúmina sérica bovina (**BSA**), que se utilizan como fuentes proteicas. El suero se ha visto que estimula la expansión del *cumulus* (Daen *et al.*, 1994), aunque algunos autores observan un efecto perjudicial de este FCS en la formación de pronúcleo masculino (Funahashi y Day, 1993). El uso de la BSA presenta disparidad de opiniones (Yamauchi *et al.*, 1996; Zheng y Sirard, 1992). Se han descrito similares porcentajes de maduración nuclear con medios suplementados con BSA frente a FCS. Sin embargo, el estudio realizado por Zheng y Sirard muestra que el suplemento proteico de BSA no sustenta la expansión del *cumulus* ni la maduración de los ovocitos porcinos como lo hace el FCS.

- **Glutation (GSH), cisteína (Cys)** y otros compuestos con grupos tioles. Estos factores protegen al ovocito contra los efectos nocivos de las especies reactivas de oxígeno generadas durante las condiciones de cultivo, manteniendo un ambiente de óxido-reducción adecuado (Meister y Anderson, 1983). Por otra parte, favorecen la formación del pronúcleo masculino (PNM) reduciendo los puentes disulfuro de las protaminas del ADN espermático. Este importante papel del GSH sobre la formación del PNM ha llevado a algunos autores a utilizar la concentración intracelular de GSH al final de la maduración, como un medidor de la maduración citoplasmática del ovocito (Yoshida *et al.*, 1993b; Funahashi *et al.*, 1994a, 1996; Coy *et al.*, 1999).

- **Gonadotropinas**. Este suplemento es uno de los factores decisivos en la MIV (Zheng y Sirard, 1992), ya que mejora la maduración nuclear y la expansión del *cumulus*. Además, ejercen una acción positiva sobre la formación del PNM (Wang y Niwa, 1995). Existen diferentes combinaciones de gonadotropinas y estradiol: eCG-hCG (Abeydeera *et al.*, 1998); eCG-hCG-estradiol (Funahashi y Day, 1993), FSH-LH (Mori *et al.*, 2000), FSH-LH-estradiol (Zheng y Sirard, 1992).

- Factor de crecimiento epidérmico (**EGF**). Este factor presenta un papel regulador, tanto autocrino como paracrino, en las funciones ováricas. Su acción parece estar mediada por la unión a receptores presentes en las células del *cumulus* (Coskum y Lin, 1992) estimulando la producción de

ácido hialurónico y su retención en la matriz extracelular de las células del *cumulus* expandidas (Prochazka *et al.*, 1998).

### 1.1.2.3 Problemática actual

Uno de los principales problemas que presentaba la MIV de los ovocitos porcinos era la baja formación del **PNM**. Yoshida *et al.*, en 1993, demostraron que durante la maduración *in vitro* del ovocito se produce síntesis intracelular de glutatión y que éste es un importante factor citoplasmático para regular la descondensación espermática y la formación del pronúcleo masculino tras la penetración. Al parecer, el glutatión es necesario para la reducción de los puentes disulfuro de la protamina espermática requerida para iniciar la descondensación. Diferentes estudios han demostrado que la utilización de medios con bajo contenido en sal, la adición de fluido folicular y la adición de cisteína al medio de maduración incrementa el contenido en glutatión del ovocito y, en consecuencia, mejoran su capacidad de formación del pronúcleo masculino (Funahashi *et al.*, 1994; Yoshida *et al.*, 1992; Yoshida *et al.*, 1993). Así, este problema ha sido hoy en día resuelto gracias a la aplicación de una serie de modificaciones en las condiciones de maduración, fundamentalmente consistentes en la adición de cisteína, cisteamina y glutamina al medio de maduración (Coy y Romar 2002; Funahashi, 2003). En la actualidad, la medición del contenido intracelular de GSH en los ovocitos se utiliza como un muy buen indicador de maduración citoplasmática, y cuando se modifican los tratamientos de MIV para conseguir mejoras, es necesario medir este parámetro para valorar si la formación del pronúcleo masculino se verá afectada por las modificaciones introducidas.

Otro de los problemas presentes, además del grado de maduración cuando se utilizan ovocitos no ovulados fisiológicamente, es el hecho de que algunos ovocitos/folículos están programados para muerte celular o **apoptosis** dando lugar a la atresia de éstos (Kane, 2003). Un porcentaje de folículos presentes en el ovario se encuentran en diferentes estadios de atresia (Markström *et al.*, 2002). Probablemente, este proceso de apoptosis comience en el folículo y posteriormente afecte al ovocito. Existen evidencias de que complejo *cumulus*-ovocito (COCs) de buena calidad, aislados de folículos que presentan un grado elevado de apoptosis en sus paredes, pierden su capacidad de desarrollo posterior (Jewgenow *et al.*, 1999). En el ovario existen diferentes reguladores específicos de la



apoptosis, incluyendo hormonas, factores de crecimiento y citoquinas (Markström *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha estudiado recientemente una relación entre el grado de atresia presente en el *cumulus* y la competencia ovocitaria; un menor grado de atresia está asociado con ovocitos de elevada capacidad de desarrollo (Hendriksen *et al.*, 2000).

El principal problema en el estudio de la atresia relacionada con la capacidad de desarrollo ovocitaria es que no existen criterios macroscópicos que nos permitan seleccionar y clasificar los folículos de acuerdo a su estado de salud. Los criterios normalmente utilizados para la determinación de la atresia son bioquímicos y no nos permiten su uso previo a la MIV (Mermillod *et al.*, 1999). Grimes e Ireland (1986), en la especie bovina, sugieren que la apariencia de la superficie de los folículos puede ser utilizada como criterio de selección de los futuros ovocitos y así, mejorar los índices de maduración *in vitro*. Estos autores proponen la clasificación de los folículos en dos categorías: folículos claros y folículos opacos. En este estudio, se demuestra que los ovocitos provenientes de folículos claros muestran tasas de maduración *in vitro* significativamente superiores a los ovocitos provenientes de los folículos opacos. También puede establecerse que los folículos claros tienen en su contenido menor concentración de estrógenos, progesterona y fluido folicular que los opacos.

Existen evidencias en algunas células de que la activación de la proteína quinasa-C inhibe la apoptosis (Kane, 2003), y es posible que pueda utilizarse este sistema de activación para inhibir la apoptosis y de esta manera mejorar los porcentajes de maduración ovocitaria.

Del mismo modo, las futuras innovaciones en los sistemas de MIV van encaminadas a la corrección de otro problema como es la **maduración citoplasmática**, que se ve asociada a la capacidad de desarrollo posterior. Los ovocitos madurados *in vitro* presentan una capacidad de desarrollo inferior a los madurados *in vivo* (Rodríguez y Farin, 2004).

Cuando el ovocito es liberado del ambiente folicular y transferido a un medio de maduración adecuado, en varias horas (dependiente de especie), este ovocito alcanza el estadio de MII y está listo para ser fecundado (Staigmiller y Moor, 1984). A pesar de que los ovocitos maduros a nivel del núcleo pueden ser fecundados, éstos pueden ser incompetentes en el desarrollo posterior, debido a deficiencias en ciertos factores citoplasmáticos

necesarios para la completa maduración. Por ejemplo, las condiciones en las que se produce la maduración *in vitro* pueden causar movimientos incompletos de las mitocondrias en el citoplasma del ovocito, y por lo tanto, afectar a la maduración posterior (Sun *et al.*, 2001).

Una incompleta maduración citoplasmática puede dar lugar a fallos durante la fecundación incluyendo la polispermia y una asincronía en la formación pronuclear (Mattioli *et al.*, 1988; Moor *et al.*, 1990) que se conocen como uno de los principales problemas de la baja capacidad de desarrollo de los ovocitos madurados y fecundados *in vitro* (Hunter, 1991).

La adquisición de la capacidad de desarrollo ocurre durante el crecimiento del ovocito dentro del folículo y tiene lugar en diferentes estadios de desarrollo folicular (Mermillod *et al.*, 1999). Los ovocitos que no completan la capacitación no serán competentes en el desarrollo posterior aunque sean capaces de reanudar la meiosis y ser fecundados. Diversos tipos de inhibidores (fisiológicos y químicos) se han estado empleando para inhibir la reanudación de la meiosis e intentar mimetizar lo que ocurre en el interior del folículo en crecimiento, dando tiempo al ovocito a acumular transcritos y mejorar su calidad citoplasmática.

#### **1.1.2.4 Inhibidores meióticos**

En la mayoría de los sistemas de MIV, los ovocitos se obtienen por aspiración de folículos de tamaño medio (3-7mm) de ovarios procedentes de matadero. Se ha observado una amplia variabilidad en la morfología nuclear de la GV (Funahashi *et al.*, 1997a) que podría influir en la progresión meiótica, maduración citoplasmática y posterior desarrollo embrionario (Abeydeera, 2002) del ovocito. Por el contrario, la morfología nuclear del estadio de GV está muy sincronizada en las cerdas en el momento del pico preovulatorio de la LH (Funahashi *et al.*, 1997a). Estos mismos autores observaron que la exposición de los ovocitos durante las 20 primeras horas de MIV a un medio con dibutilil-adenosínmonofosfato cíclico (**dbAMP<sub>c</sub>**) aumentaba la homogeneidad de la maduración nuclear de los ovocitos. Además, el porcentaje de blastocistos se incrementaba notablemente con respecto al control. Eppig y Downs (1984) estudiaron que las purinas podían mantener el arresto meiótico dada su capacidad para inhibir las fosfodiesterasas, incrementando de esta manera los niveles de AMPc intraovocitarios. También es posible mantener a los ovocitos en

arresto meiótico tratándolos con inhibidores de la fosfodiesterasas (PDE *Phosphodiesterase inhibitors*), que previenen la degradación de AMPc (Sirard, 2001). Además, se ha visto que la hipoxantina presente en el fluido folicular produce una inhibición temporal en la maduración de los ovocitos bovinos (Sirard, 2001).

El estadio de GV es muy importante para los procesos de transcripción y traducción, no sólo para las moléculas específicas de estadio necesarias para la GVBD (Khatir *et al.*, 1998), sino también para la síntesis y almacenamiento de proteínas y transcritos que juegan un papel muy importante en el desarrollo embrionario posterior.

Diversos autores (Avery y Greve, 1997; Lonergan *et al.*, 1997; Mermillod *et al.*, 2000) sugieren que si los ovocitos son cultivados *in vitro* en presencia de inhibidores meióticos reversibles manteniéndolos en el estadio de GV antes del período de maduración, estos ovocitos podrían tener más posibilidades para completar el proceso de capacitación ovocitaria que tiene lugar *in vivo* (Hyttel *et al.*, 1997), y de esta manera adquirir mayor capacidad de desarrollo. El objetivo es darle al ovocito tiempo adicional para sintetizar y/o modificar y almacenar proteínas y ribonucleoproteínas de nueva síntesis que puedan posteriormente incrementar la capacidad de desarrollo.

En este sistema de maduración, los ovocitos se cultivan en presencia de inhibidores de la reanudación meiótica que actúan de manera reversible para posteriormente transferirse al medio adecuado para completar la maduración. Hay diferentes métodos de inhibición de la meiosis. Unos están basados en inhibidores fisiológicos como son las paredes foliculares (Carbonneau y Sirard, 1994), células murales de la granulosa homólogas y heterólogas (Kalous *et al.*, 1993; van Tot *et al.*, 1996), células de la teca (Richard y Sirard, 1996), o el cultivo de folículos antrales intactos (Foulady Hashta *et al.*, 1998). Otros están basados en el uso de inhibidores químicos. Entre éstos se encuentran la **cicloheximida** que es un inhibidor de la síntesis proteica (Lonergan *et al.*, 1997; Saeki *et al.*, 1997), la 6-dimetilaminopurina (**6-DAMP**) un inhibidor no específico de la fosforilación (Fulka *et al.*, 1991; Lonergan *et al.*, 1997; Saeki *et al.*, 1997; Avery *et al.*, 1998), el 5,6-dicloro-1-b-dibofuranosilbenzimidazol (**DRB**) un inhibidor transcripcional (Rodríguez y Farin, 2004), la butirolactona I (**BL-1**) un componente natural que inhibe las quinasas ciclo-dependientes y tiene

también efecto inhibitorio en otras proteínquinasas como la MAP quinasa (Motlik *et al.*, 1998; Lonergan *et al.*, 2000; Kubelka *et al.*, 2000), la roscovitina (**ROS**), una purina conocida por inhibir específicamente en numerosos sistemas celulares el MPF con actividad quinasa (Mermillod *et al.*, 2000; Kasinathan *et al.*, 2001; Meijer y Raymond, 2003) y por último combinaciones de estos inhibidores químicos como la combinación de BL-I más ROS (Ponderato *et al.*, 2001).

Estudios de cocrystalización indican que la BL-I y la ROS presentan el mismo sistema de inhibición, compitiendo por el paquete de unión de la cdc2 quinasa al ATP y por lo tanto, bloqueando la actividad fosforilativa (Kubelka *et al.*, 2000; Motlik *et al.*, 2000).

La roscovitina es un potente inhibidor de MPF, que se ha comprobado que puede inhibir un menor número de kinasas que la 6-DAMP pero con una mayor especificidad por su competencia con el sitio de unión al ATP de la subunidad catalítica cdc2. Mermillod *et al.*, (2000) mostraron en la vaca que utilizando la ROS a concentraciones de 25 $\mu$ M se bloqueaba eficientemente la reanudación de la meiosis durante 24h de cultivo. Este efecto inhibitorio fue completamente reversible, ya que el 89% de los ovocitos tratados con ROS, y cultivados posteriormente en ausencia de inhibidor durante las siguientes 24h, alcanzaron el estadio de MII. Los primeros estudios de maduración con ROS en ovocitos porcinos fueron realizados por Krischek y Meinecke en 2001 utilizando diferentes concentraciones de este inhibidor. Estos autores demostraron que la ROS a concentración de 50 $\mu$ M durante 48h bloqueaba la actividad de la histona H1 y parcialmente, prevenía la activación de la MAP quinasa. Del mismo modo, cultivando los ovocitos durante un período de 30h observaron que esta inhibición era reversible. En 2003, Ju *et al.* demostraron una interacción entre la duración y la concentración de la ROS. Recientes estudios en ovocitos porcinos demuestran que la ROS a 50 $\mu$ M durante un período de 24h es efectiva en el mantenimiento de los ovocitos en estadio de GV, y esta inhibición desaparece al cultivar los ovocitos en el medio de MIV adecuado (Coy *et al.*, 2003). En el 2004, se han obtenido los primeros lechones mediante el uso de ovocitos premadurados con ROS y fecundados *in vitro* (Coy *et al.*, 2004, 2005).

## **1.2 FECUNDACIÓN**

### **1.2.1 FECUNDACIÓN IN VIVO**

La fecundación es el proceso por el cual dos células altamente diferenciadas, ovocito y espermatozoide, con dotación cromosómica haploide ( $n$ ) van a interactuar, unirse y activarse mutuamente para dar lugar a un cigoto con dotación cromosómica diploide ( $2n$ ). La fecundación de ovocitos porcinos tiene lugar unas pocas horas después de la ovulación, en la unión ampular ístmica del oviducto (Hunter, 1991).

Para ello, es necesario que tanto el ovocito como el espermatozoide experimenten las modificaciones que den lugar a la formación de un cigoto viable.

#### **1.2.1.1 Capacitación espermática**

Los espermatozoides recién eyaculados no son capaces de fecundar, por lo que deben sufrir una serie de cambios denominados tradicionalmente como capacitación espermática (Austin y Chang, 1951). Este proceso consiste básicamente en modificaciones bioquímicas de la membrana plasmática y en el cambio de movimiento del flagelo espermático, proceso conocido como hiperactivación espermática (Yanagimachi, 1994). Durante este proceso, el espermatozoide sufre los cambios necesarios que le permitirán más tarde la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa. La capacitación espermática tiene lugar durante el paso de estas células a través del tracto genital femenino. En el cerdo, el espermatozoide necesita de 5 a 6h en el interior del tracto genital femenino para adquirir la capacidad de penetrar al ovocito (Polge, 1978).

El colesterol y el sulfato de colesterol de la membrana de los espermatozoides limitan la permeabilidad iónica de la misma y la inserción y movilidad de las proteínas dentro de la bicapa lipídica, brindando de este modo una mayor rigidez y estabilización de la membrana (Suzuki y Yanagimachi, 1989). Durante el proceso de la capacitación, los componentes de la superficie espermática son modificados o eliminados por secreciones del aparato reproductor femenino, entre ellos la desulfatación del colesterol sulfato, lo que desestabiliza la bicapa fosfolipídica y permite la

activación acrosomal. Todo ello da lugar a una modulación de la fluidez de la membrana espermática, salida de colesterol, 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 calcio, del AMPc y del pH intracelular. Esta alcalinización del citoplasma del espermatozoide provoca la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  y por tanto, la entrada masiva de este catión (Töpfer-Petersen *et al.*, 2000) que será esencial para el inicio de la reacción acrosómica. Al mismo tiempo tiene lugar la fosforilación de determinadas proteínas, entre ellas la tirosina mediante una proteínquinasa A (Breitbart, 2002).

En el cerdo, sólo unos pocos miles de espermatozoides alcanzan la región ístmica, y sólo un pequeño número llega al lugar de fecundación (Hunter, 1991), minimizando de este modo las posibilidades de fecundación polispérmicas y asegurándose un número óptimo de espermatozoides en el lugar y momento de la unión al ovocito. Este proceso capacitante se inicia mientras los espermatozoides pasan por el cérvix o cuello uterino, se continúa posteriormente en el útero y se completa en el oviducto a nivel de la ampolla.

### **1.2.1.2 Reconocimiento y fusión de gametos**

Una vez que los espermatozoides alcanzan el lugar de fecundación, éstos tienen que atravesar las barreras que presenta el ovocito, entre las que se encuentran las células del **cumulus**, la **ZP** y la **membrana plasmática**.

Los espermatozoides deben estar parcialmente capacitados y no reaccionados (acrosoma intacto) para poder atravesar las células del **cumulus**. Se sabe que únicamente los espermatozoides capacitados se mueven libremente dentro de la matriz del **cumulus**, mientras que los no capacitados se unen a la superficie pero no pueden atravesarla (Myles y Primakoff, 1997).

Se ha estudiado una proteína llamada PH20 (Myles y Primakoff, 1997) que tiene actividad hialuronidasa, gracias a la cual el espermatozoide es capaz de hidrolizar el ácido hialurónico y atravesar la densa capa del **cumulus** ayudado por su movimiento hiperactivo.

Una vez atravesadas las células del *cumulus*, el espermatozoide tiene que unirse y atravesar la **ZP**. Esta unión está mediada por la interacción entre moléculas con gran afinidad presentes en la superficie tanto del espermatozoide como del ovocito. Existen dos tipos de uniones. En la unión primaria, considerada relativamente específica de especie, la glicoproteína ZP3 del ratón (o equivalente en otra especie) de la zona pelúcida se une a proteínas presentes en la membrana plasmática del espermatozoide capacitado y no reaccionado. En este proceso juegan un papel importante los carbohidratos de estas glicoproteínas como son la manosa, fucosa y ácido siálico. La unión del espermatozoide con la ZP3 induce la exocitosis del acrosoma a través de dos vías de señal-activación. La primera produce la activación de la proteína de unión GTP y de la fosfolipasa C (PLC). De esta manera, se produce una elevación del calcio citoplasmático del espermatozoide. La segunda vía, estimulada también por el mismo receptor, incrementa el flujo de calcio a través de los canales tipo T (Primakoff y Myles, 2002). La unión secundaria acontece tras la reacción acrosómica. El espermatozoide reaccionado permanece unido a la ZP2 gracias al enzima proacrosina que se encuentra anclada a la membrana acrosomal interna. Los espermatozoides que no reconozcan y se unan a las glicoproteínas de la ZP sufriendo la reacción acrosómica no fecundarán al ovocito (Töpfer-Petersen *et al.*, 2000).

Tras la reacción acrosómica y la unión secundaria a la ZP, el espermatozoide atraviesa el espesor de la ZP para alcanzar el espacio perivitelino. Tan pronto como la cabeza espermática se adhiere firmemente a la superficie del ovocito, la motilidad residual del flagelo fuerza a éste a rotar dentro de la zona hasta que se incorpora totalmente al espacio perivitelino, momento en que la motilidad disminuye bruscamente y la rotación cesa (Gaddum-Rose, 1985). 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 este punto la fusión entre ambas membranas (Moore y Bedford, 1983). El espermatozoide se incorpora en su totalidad dentro del ooplasma. La región posterior de la cabeza, junto con el flagelo, se internalizan mediante fusión de membranas, mientras que la porción anterior se engloba por fagocitosis (Gaddum-Rose, 1985). En el proceso de fusión se conocen diferentes proteínas asociadas; éstas pertenecen a la familia ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*) y entre ellas destacan la fertilina y ciritestina (Primakoff y Myles, 2002). La fertilina y ciritestina son proteínas

que se expresan en los testículos y se localizan en la cabeza del espermatozoide. La fertilina es un heterodímero y la ciristestina (ADAM3) está compuesta de un solo polipéptido (Cuasnicú *et al.*, 2001; Heinlein *et al.*, 1994) que parece que media en el anclaje del espermatozoide a la membrana plasmática del ovocito. Una subunidad de la fertilina, a través de un péptido presente en la molécula, se ha propuesto que participa en la fusión.

### **1.2.1.3 Activación del ovocito**

La fusión de las membranas de ambos gametos desencadena la activación del ovocito (Yanagimachi, 1994) mediante una cascada de señales de transducción que darán lugar al cigoto diploide. La activación se puede definir como una serie de cambios celulares que son inducidos por el espermatozoide en el ovocito y producen la reanudación de la meiosis, y posterior transformación del ovocito en un embrión capaz de desarrollarse (Ben-Yosef y Shalgi, 2001).

#### *a) Mediadores celulares en la activación*

⇒ En todos los mamíferos se sabe que el **ion calcio** ( $\text{Ca}^{+2}$ ) participa como segundo mensajero en la cascada de eventos que conducen a la activación. El incremento en la concentración de calcio intracelular ocurre entre los tres primeros minutos de la fusión de membranas y se presenta como en oleadas desde la entrada espermática (Ben-Yosef y Shalgi, 2001). El  $\text{Ca}^{+2}$  se incrementa desde niveles basales de 50-100nmol/l hasta 600-1000nmol/l dependiendo de la especie (Miyazaki *et al.*, 1993). El retículo endoplasmático se reconoce como el lugar de almacenamiento y liberación de calcio, y en él se encuentran los receptores del inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{InsP}_3\text{-R}$ ). La primera entrada de calcio es seguida por una serie de cortas entradas de elevada amplitud que se denominan oscilaciones de calcio. Éstas se observan en todos los ovocitos de mamíferos pero su frecuencia es específica de especie. Conforme avanza el proceso de fecundación, la amplitud y frecuencia de los inlujos de calcio disminuyen mientras que la duración se incrementa hasta que se produce el cese total de las oscilaciones, que tiene lugar durante la interfase y la formación pronuclear (varias horas después de la entrada del espermatozoide).



El incremento intracelular de calcio induce la **reacción cortical** en el ovocito. Los gránulos corticales (GC) son vesículas secretoras formadas durante estadios tempranos de la ovogénesis. Están localizadas en la región cortical del ovocito, y contienen enzimas y material glicosilado. Durante la activación se produce la reacción cortical y el contenido de estos gránulos se libera al espacio perivitelino modificando las glicoproteínas de la ZP, de tal modo que ésta se torna "refractaria" a la penetración espermática, proceso denominado "reacción de zona" (Yanagimachi, 1988). De esta manera se establece parte del bloqueo a la polispermia. Existen evidencias, actualmente en fase de investigación, de que el bloqueo de la ZP a la entrada de espermatozoides no se basa en un único mecanismo, sino que parecen estar involucrados fenómenos de proteólisis, reconocimientos de residuos glúcidos y formación de puentes disulfuro en la ZP (Benoff, 1997).

También existen evidencias de bloqueo a nivel de la membrana plasmática de los ovocitos de algunos mamíferos como el conejo (Yanahimachi, 1994), pero el mecanismo por el cual esta membrana se bloquea es desconocido pudiendo actuar o no los GC.

Por otra parte, este aumento de  $Ca^{+2}$  también produce la **reanudación de la meiosis**. Los ovocitos de mamíferos como explicamos anteriormente quedaban en arresto meiótico (MII) una vez ovulados. Este arresto es debido a la presencia de elevadas cantidades del MPF responsable del ensamblaje del huso, condensación de la cromatina y rotura de la envoltura nuclear (Williams, 2002). Durante la MII este factor permanece activo debido a la presencia del factor citostático que previene la degradación de la ciclina B1. La elevación del  $Ca^{+2}$  intracelular producido por el espermatozoide induce la degradación de la ciclina (Lorca *et al.*, 1993) mediante la pérdida del factor citostático activo, y de esta manera la cromatina ovocitaria entra en anafase II (Williams, 2002).

Otra proteínquinasa importante en la regulación del ciclo meiótico es la MAP quinasa. Este grupo de proteínas se encargan de la fosforilación de proteínas cromosómicas importantes en el mantenimiento de la cromatina condensada durante la transición de fases MI a MII. Al mismo tiempo, previenen la formación de la envoltura nuclear mediante la fosforilación de láminas nucleares (Williams, 2002). Durante la activación del ovocito, la actividad de las MAP-quinasas decrece; este descenso es necesario para que se pueda formar la envoltura nuclear (Moos *et al.*, 1995).

Durante la activación también se producen cambios en el patrón de síntesis proteica (Latham *et al.*, 1991), los cuales resultan en parte del reclutamiento de ARNm materno que está presente en el citoplasma del ovocito pero no se traduce antes de la activación ovocito, y por otra parte de modificaciones post-traduccionales producidas en las proteínas existentes. Finalmente, el comienzo de la transcripción y traducción de las proteínas codificadas por el nuevo genoma embrionario tiene lugar en el estadio de dos células en ratón, y durante estadios tardíos preimplantatorios en la especie humana; este proceso se conoce como activación de los genes del embrión.

⇒ Además del  $\text{Ca}^{+2}$ , se sabe que el **pH** también participa en los eventos de la activación. La fecundación en diferentes especies va acompañada por una alcalinización. Se ha especulado que las enzimas que se activan mediante el  $\text{Ca}^{+2}$  necesitan un ambiente adecuado de elevado pH para actuar (Ben-Yosef y Shalgi, 2001).

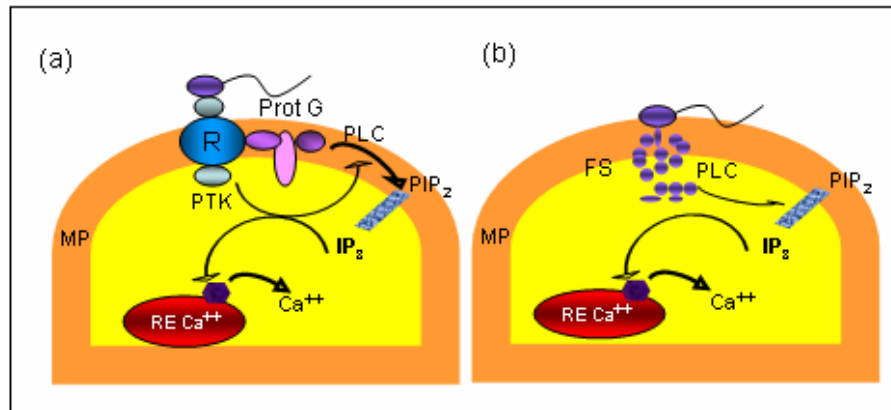
⇒ El **InsP<sub>3</sub>** también se conoce como segundo mensajero en la activación. Este factor se produce por la hidrólisis del fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) mediante una fosfolipasa C específica de fosfoinositoles (PLC). La liberación de calcio durante la activación es inducida por la acción del InsP<sub>3</sub> sobre sus receptores InsP<sub>3</sub>-R presentes en los almacenes de calcio del retículo endoplasmático. Y además, está mediada por un mecanismo de retroalimentación positivo que provoca más liberación del catión del retículo endoplasmático, la cual se revierte a determinadas concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$ . Este cierre de los canales de los InsP<sub>3</sub>-R permite la re-entrada de calcio citoplasmático mediante la actividad de ATPasas del retículo endoplasmático (RE) dependientes de  $\text{Ca}^{+2}$  y vuelta a los niveles basales de  $\text{Ca}^{+2}$ . Esto coincide con las oscilaciones de  $\text{Ca}^{+2}$  anteriormente citadas. Se sabe que aunque un incremento de calcio es suficiente para producir la activación, las oscilaciones son necesarias para posteriores eventos de desarrollo (Tesarik y Mendoza, 1999).

⇒ **sn-1,2 diacilglicerol (DAG)** provocado por la hidrólisis del PIP<sub>2</sub>. Este factor causa la activación de la proteína quinasa C (PKC) que tiene diferentes efectos en las células somáticas (Williams, 2002).

b) Modelos de activación

Se han propuesto dos modelos en la activación ovocitaria (Figura 3).

FIGURA 3. (a) Activación mediada por receptor. (b) Activación mediada por factor espermático.



Activación mediada por receptor (figura 2a). La unión del espermatozoide mediante ligandos a los receptores específicos del oolema (MP) produce una señal de transducción que media en la cascada de los eventos celulares. Este reconocimiento entre el espermatozoide y el receptor del ovocito es análogo a las uniones entre los receptores de las células somáticas con las respectivas hormonas. Se ha sugerido que el espermatozoide se puede unir a un receptor acoplado a la proteína G (Prot G) o a un receptor tirosínquinasa (R). Ambos receptores están presentes en el oolema y median en la activación artificial. La unión a estos receptores de membrana provoca la activación de una fosfolipasa C (PLC), y ésta al ser activada interviene en el paso de fosfoinositol bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ) a  $\text{InsP}_3$  y diacilglicerol (DAG).

Activación por factor espermático (figura 2b). Es la más aceptada en la actualidad (Williams, 2002). La fusión entre el espermatozoide y el ovocito permite la liberación de un componente espermático (FS) en el interior del ooplasma que es capaz de inducir los eventos tempranos de la cascada de la activación. Además, la inyección de extractos espermáticos en el interior de ovocitos induce el incremento inicial de  $\text{Ca}^{+2}$ , con las correspondientes oscilaciones de  $\text{Ca}^{+2}$  posteriores y una completa activación seguida por el desarrollo hasta estadio de blastocisto. Sousa *et*

*al.* (1996) observaron que las oscilaciones de calcio persisten durante varias horas a través de estudios realizados mediante la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), mientras que no se observaron estas oscilaciones en los ovocitos inyectados sin espermatozoides (*sham*) demostrando el papel del factor espermático en el proceso de la activación.

Se sabe que este factor espermático es una proteína sensible al calor (Swann, 1990). Este factor, que se dispone en la cabeza espermática debe inducir oscilaciones de calcio similares a las producidas durante la fecundación y debe inducir la liberación de calcio del RE vía  $\text{InsP}_3$ -R.

Se han estudiado diferentes procedencias de este factor. Inicialmente se postuló que era una proteína de 30-100kDa denominada oscilina (Parrington *et al.*, 1996), pero más tarde se demostró que no tenía actividad para producir oscilaciones de calcio (Wolny *et al.*, 1999). Otro candidato fue el receptor c-kit (Sette *et al.*, 1997) pero se vio de igual manera que no producía oscilaciones repetitivas en el ovocito. Más tarde, se pensó en la PLC como factor espermático (Jones *et al.*, 1998) y se aislaron diferentes isoformas, pero ninguna coincidía con la actividad del factor espermático (Parrington *et al.*, 2002). Aunque primeramente se postuló en un factor soluble, se descubrió que éste se localizaba en la periteca (PT) del espermatozoide (Perry *et al.*, 2000). Recientemente se ha clonado una proteína de la PT conocida como PT32 de 32kDa que se presenta como el candidato del factor espermático (Williams, 2002). Esta proteína tiene localización post-acrosomal siendo una de las primeras partes de la PT expuestas al citoplasma del ovocito. Es fácilmente extraíble mediante procesos de congelación-descongelación espermática o mediante agentes reductores. Se ha visto que esta proteína recombinada es capaz de inducir la activación en ovocitos porcinos. Aún así se requieren más estudios (Williams, 2002).

#### **1.2.1.4 Formación de pronúcleos y singamia**

Una vez en el interior del ovocito, se produce la separación de la cola de la cabeza espermática durante la formación del pronúcleo masculino (PNM). A continuación, tiene lugar la pérdida de la membrana nuclear del espermatozoide de modo que la cromatina queda expuesta directamente al

citoplasma del ovocito. Esta cromatina sufre un proceso de descondensación que se inicia en la región posterior de la cabeza y continua hasta la región anterior (Terada *et al.*, 2000). La descondensación se produce mediante la reducción de los puentes disulfuro de las protaminas y es llevada a cabo por el glutatión reducido presente en el ooplasma del ovocito (Yanagimachi, 1994). Posteriormente, comienza la sustitución de protaminas por histonas y se forma una nueva envoltura nuclear, dando lugar al PNM. Las mitocondrias procedentes del espermatozoide son degradadas mientras que las mitocondrias maternas pasan a la siguiente generación.

El factor que controla la formación del PNM se conoce como factor de crecimiento del PNM (Thibault *et al.*, 1987) y aparece en el ovocito durante la fase final de su maduración (Ding *et al.*, 1992)

Por otra parte, y tras la extrusión del segundo corpúsculo polar (CP), el genoma haploide materno también sufre un proceso de descondensación, se forma la membrana nuclear y queda constituido el pronúcleo femenino (PNF). La síntesis de ADN comienza simultáneamente en ambos PN.

Una vez formados, ambos pronúcleos comienzan a migrar hasta que aproximadamente a las 5-6h de la penetración espermática tiene lugar la aposición central de los mismos, se desintegran sus membranas nucleares y sus pares de cromosomas homólogos se asocian antes de efectuar la primera división mitótica (Hunter, 1988). Este proceso de unión o singamia, está relacionado con el citoesqueleto. Los microtúbulos son necesarios para que ocurra la división celular y la formación y migración de los pronúcleos. Además, se sabe que el espermatozoide incorpora su centriolo dentro del ovocito y pasa a constituir el centrosoma del cigoto. Así que la herencia del centrosoma se produce a través de la línea paterna. En ratón, a diferencia del resto de especies, los centriolos maternos son los que se encargan de la organización microtubular (Schatten, 1994).

La unión de los PN masculino y femenino se considera el final del proceso de fecundación y el principio del desarrollo embrionario (Yanagimachi, 1988). En los mamíferos este proceso dura aproximadamente 12 horas.

### 1.2.2 FECUNDACIÓN IN VITRO

La fecundación *in vitro* (FIV) ha sido definida como la penetración de espermatozoides capacitados en ovocitos maduros fuera del tracto genital femenino. Sin embargo, esta definición clásica ha sido hoy en día modificada con el desarrollo de la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), que se considera una variante de la FIV tradicional.

Al igual que en la MIV, existen también referencias en cuanto a los medios utilizados para la FIV. Se han estado empleando: el TCM-199 (*Tissue Culture Medium*; Yoshida *et al.*, 1990; Coy *et al.*, 1999), el medio BO (*Brackett and Oliphant Medium*; Wang *et al.*, 1995; 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, 1997) y el medio TALP modificado (*Tyrode-Albumin-Lactate-Piruvate Medium*; Coy *et al.*, 2002; Rath *et al.*, 1999). Es difícil establecer comparaciones entre los diversos medios, pues los protocolos utilizados por los diferentes autores no son exactamente iguales. Además, las variaciones en la composición de los medios y suplementos afectan a más de un componente, por lo que las diferencias no pueden atribuirse a un solo factor.

Otras variables estudiadas en relación a la FIV son la concentración espermática (Coy *et al.*, 1993a; Xu *et al.*, 1996; Martínez, 2002), el tiempo de coincubación espermatozoide-ovocito (Coy *et al.*, 1993b; Martínez, 2002), la procedencia de los espermatozoides (Rath y Niemann, 1997), el volumen del medio de cocultivo (Coy *et al.*, 1993c) y tratamientos de lavado espermático, centrifugación o selección previos a la FIV (Matás *et al.*, 2003).

Uno de los principales problemas que presenta la FIV porcina en la actualidad es la elevada tasa de polispermia, posiblemente debido a que el número de espermatozoides utilizado es demasiado alto en comparación con la fecundación *in vivo* (Hunter, 1999). Uno de los factores a modificar sería la reducción del número de espermatozoides (Coy *et al.*, 1993a) o el uso de adenosina en vez de cafeína en los medios de FIV, ya que esta adenosina promueve la capacitación pero inhibe la reacción acrosómica espontánea (Funahashi y Nagai, 2001; Funahashi y Romar, 2004).

Se ha especulado que parte del problema de la polispermia sea debido a una inadecuada maduración ovocitaria; sin embargo, cuando se utilizan ovocitos recién ovulados y fecundados *in vitro* se obtienen también fecundaciones polispérmicas (Coy *et al.*, 1993a,b,c; Martínez *et al.*, 1996). Además se han obtenido lechones mediante la transferencia de ovocitos MIV a una hembra receptora y posteriormente inseminada (Coy *et al.*, 1999), lo cual también indica que el problema de la polispermia podría ser inherente a la FIV y no a la MIV. En la actualidad, mientras no se consiga identificar el factor o factores que impiden el adecuado establecimiento de la reacción de zona *in vitro* para bloquear la polispermia, la técnica de ICSI se presenta como una alternativa importante en la fecundación *in vitro* en la especie porcina.

### **1.2.2.1 INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI)**

#### *1.2.2.1.1 Concepto y aplicaciones*

La Inyección Intracitoplásmica de Espermatozoides (ICSI) es una técnica de fecundación *in vitro* ampliamente usada en los laboratorios de reproducción asistida en la especie humana. La técnica consiste en la introducción de un único espermatozoide en el interior del citoplasma de un ovocito maduro (en estadio de MII) con la ayuda de un micromanipulador, evitando el proceso de unión del espermatozoide a la zona pélcida del ovocito y penetración a través de ésta y de la membrana plasmática. Con esta técnica se pueden obviar acontecimientos que sufren los espermatozoides como la capacitación y la reacción acrosómica, que tienen lugar en el tracto reproductor femenino, la maduración en el epidídimo e incluso la espermiogénesis en el testículo (Yanagimachi, 1997).

El desarrollo de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides ha revolucionado el campo de la reproducción asistida en la especie humana y ofrece nuevas perspectivas en el tratamiento de la esterilidad de causa masculina. La ICSI permite conseguir fecundación y gestación incluso en casos extremos en los que se recupera un escaso número de espermatozoides apenas móviles. En la actualidad, sólo aquellos pacientes

con detención en la espermatogénesis no podrían beneficiarse de estas técnicas de microinyección.

Los nacimientos a partir de ICSI hoy en día son frecuentes en la mayoría de los centros de fertilidad humana. Sin embargo, fueron necesarios experimentos iniciales con modelos animales, principalmente ratones, antes de conseguir fecundación mediante ICSI en el hombre. Actualmente, el modelo murino es rechazado por muchos investigadores a causa de sus diferencias específicas con otros mamíferos, ya que el ratón no requiere un centrosoma derivado del espermatozoide para completar la primera división celular (Catt, 1996). De este modo, las especies domésticas tales como la vaca, el caballo o el cerdo, están siendo el foco de atención de los programas de investigación de numerosos laboratorios. La experimentación con animales resultaría útil para comprobar la seguridad de la propia técnica y podría ofrecer grandes ventajas para el entrenamiento de técnicos en ICSI humana (Catt y Rhodes, 1995).

También serían necesarios estudios utilizando modelos animales para determinar las repercusiones genéticas inmediatas, y en sucesivas generaciones, que conlleva el uso de la técnica de la ICSI y otras técnicas de reproducción asistida (Yanagimachi, 1997).

Independientemente de su utilidad en el campo de la reproducción humana, la micromanipulación en ratones y animales domésticos ha sido usada en las dos últimas décadas para el desarrollo y perfeccionamiento de la tecnología de la clonación y la producción de animales transgénicos (Nagashima *et al.*, 2003).

Además de los aspectos clínicos, hay numerosas razones para el estudio de la inyección de espermatozoides en el interior de ovocitos de animales, ya que esta técnica nos permite investigar acerca de aspectos fundamentales del proceso de la fecundación como la interacción con el espermatozoide en el interior del ovocito y aspectos relacionados con el desarrollo embrionario temprano (Rho *et al.*, 1998). Debe haber también aplicación de la ICSI en animales en los que por cualquier razón no es posible la fecundación *in vivo* o *in vitro* por el método clásico (Catt, 1996). Por ejemplo, la ICSI representa un valioso potencial en los programas de recuperación de especies en peligro de extinción, donde el número de gametos disponibles se encuentra bastante limitado (Iritani *et al.*, 1998).



También es de mucha utilidad en la producción de animales de granja de un sexo determinado (Probst y Rath, 2003), en la producción de animales modificados genéticamente, o en la obtención de descendencia a partir de animales de baja capacidad fecundante en FIV o espermatozoides dañados, pero con elevado valor genético.

La ICSI en la especie porcina está experimentando un gran desarrollo como técnica cada vez más necesaria en los procesos de fecundación con espermatozoides procedentes de animales con elevado valor genético o reproductivo. Además, permite reducir la polispermia, uno de los principales problemas de la FIV porcina, ya que sólo un espermatozoide se inyecta en el interior de un ovocito.

Las desventajas de la ICSI incluyen la necesidad de una compleja instrumentación, personal preparado y un efectivo protocolo de trabajo que permita la inyección del espermatozoide en el ovocito en un intervalo menor de 1 minuto para poder obtener un número considerable de ovocitos inyectados.

En cerdos, además de estas dificultades hay que sumar las asociadas al desarrollo embrionario, elevada partenogénesis (Kolbe y Holtz, 1999) y un número muy bajo de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto (Klocke, 1999).

#### *1.2.2.1.2 Antecedentes históricos*

La inyección de un espermatozoide en el citoplasma del ovocito no es una innovación reciente. Los primeros estudios en ICSI se realizaron en equinodermos (Hiramoto, 1962) examinando la activación ovocitaria y los eventos post-fecundación. Posteriormente, la técnica fue utilizada en anfibios (Brun, 1974). En cuanto a las primeras inyecciones en mamíferos, éstas se realizaron en hámster (Uehara y Yanagimachi, 1976), donde se observó descondensación de la cabeza espermática, formación de pronúcleo y posterior desarrollo embrionario. Además, se vio que el núcleo espermático es una organela estable, y que los factores citoplasmáticos del ovocito controlan la transformación de ese núcleo en pronúcleo masculino. En 1983, Markert obtuvo fecundación en ratones y demostró la capacidad que tienen los espermatozoides para formar pronúcleos cuando son inyectados en ovocitos de otras especies. En este trabajo también se

observó la capacidad de los ovocitos de ratón de formar blastocistos *in vitro* cuando son inyectados con espermatozoides de su misma especie.

En 1989, Keefer observó en conejos que el método de preparación espermática antes de la ICSI tenía un efecto en la posterior activación y formación pronuclear, observándose una mayor formación de pronúcleos cuando inyectaba espermatozoides capacitados.

Las primeras investigaciones de esta técnica en animales de interés zootécnico (Catt y Rhodes, 1995) demuestran que ovocitos porcinos, ovinos y bovinos pueden dar lugar a formación pronuclear y desarrollo embrionario limitado sin activación exógena mediante la técnica de la ICSI. Además en algunas especies como en ovino, la simple inyección aparentemente era suficiente para activar al ovocito, mientras que en otras la introducción del espermatozoide era lo que producía la activación. En 1996, este mismo equipo de investigación obtuvo porcentajes de fecundación más elevados que en el trabajo anterior y lo atribuyeron a la adición de 25mM  $Cl_2Ca$  al medio de preparación de los espermatozoides. Además, obtuvieron por primera vez fecundación con ICSI utilizando semen sexado (O'Brien *et al.*, 1996).

#### 1.2.2.1.3 Aspectos técnicos

Existen diversos aspectos que juegan un importante papel en el éxito de la técnica de inyección de espermatozoides. Por ejemplo, la preparación de las pipetas, tanto la pipeta de sujeción como la de inyección del espermatozoide, que son de crucial importancia. Una buena puesta a punto y un correcto uso del equipamiento facilitan el proceso de inyección. El entrenamiento en el proceso de inyección es de máxima importancia antes de comenzar a realizar ICSI y requiere mucha práctica para obtener la menor variabilidad posible. Además de estos parámetros técnicos, las características del ovocito también juegan su papel y pueden influir en los resultados de la ICSI. Futuros avances en el proceso de inyección y la posible introducción de otras herramientas deberían ayudar a mejorar posibles fallos de la técnica (Joris *et al.*, 1998).

En relación al equipamiento requerido para realizar esta técnica, es necesario un microscopio invertido con dos micromanipuladores y dos

inyectores. La presencia de pipetas adecuadas y la correcta posición de éstas en el microscopio son importantes para la realización de una fácil inyección. El microscopio debe tener x200 ó x400 de magnificación ya que algunos detalles se pierden a magnificación inferior. Además, debe disponer de una placa térmica para poder trabajar a la temperatura deseada (en el caso del cerdo a 38.5 °C). La óptica utilizada también debe facilitar el proceso. Los dos métodos más empleados son el *Direct Interference Contrast* (DIC) y el *Hoffman Modulation Contrast* (HMC). Su elección dependerá de dónde se vaya a realizar la microinyección. DIC se utilizará cuando el material empleado sea de cristal, y HMC cuando vayamos a utilizar material plástico. Por lo general, los micromanipuladores estarán montados en el microscopio, el situado a la derecha del técnico para la pipeta de microinyección y el de la izquierda para la de sujeción; ambos pueden desplazarse en las direcciones de los ejes x-, y-, z-.

Existen una serie de consideraciones a tener en cuenta durante la realización de la técnica, que detallamos a continuación:

⇒ Inmovilización del espermatozoide. La inmovilización puede tener diferentes efectos en el espermatozoide: por un lado, causa daños en la membrana plasmática lo cual permitiría la reacción acrosómica, estimula cambios en el espermatozoide necesarios para inducir la activación ovocitaria y facilita la descondensación y posterior formación del pronúcleo masculino, y por otro lado, previene daños en las estructuras celulares del ovocito por el movimiento activo del flagelo del espermatozoide (Dozortsev *et al.*, 1995b; Kasai *et al.*, 1999). La inmovilización espermática ha sido utilizada para la ICSI en la vaca (Catt y Rhodes, 1995), el caballo (Grondahl *et al.*, 1997), la oveja (Catt y Rhodes, 1995) y el cerdo (Catt y Rhodes, 1995). La inmovilización se realiza mediante un golpe suave en el flagelo espermático con la pipeta de microinyección.

⇒ Aspiración del citoplasma del ovocito. De este modo se provoca la rotura de la membrana citoplasmática y nos aseguramos de que nos encontramos en el interior del ovocito. Algunos estudios demuestran que una vigorosa aspiración, incluso permite unos porcentajes de fecundación mayores que una aspiración suave (Tesarik y Sousa, 1995). Por otra parte, la inyección de un ovocito se puede ver dificultada por las características

propias de éste. La penetración a través de la ZP y la forma de ruptura del oolema puede influenciar el resultado del procedimiento de inyección. No todos los ovocitos responden igual a la microinyección y ofrecen una resistencia variable cuando se pretende atravesar la membrana plasmática. Estas características del ovocito normalmente no pueden evidenciarse mediante una evaluación morfológica, sólo son evidentes durante la realización del proceso. Un porcentaje variable de los ovocitos microinyectados se degeneran como consecuencia de la inyección, debido al daño ocasionado por la pipeta.

⇒ La polivinilpirrolidona (PVP). Se utiliza habitualmente con una concentración final de 5-10% para retardar la motilidad de los espermatozoides y permite un buen control del fluido en el interior de la pipeta, con la intención de facilitar su manejo para la ICSI. Es más difícil controlar el volumen inyectado en el ovocito cuando no se usa PVP aunque se han obtenido resultados similares con o sin su utilización (Hlinka *et al.*, 1998).

⇒ La posición del corpúsculo polar (CP). Para evitar daños en la placa metafásica, el ovocito se inyecta con el CP lo más lejos posible del lugar de inyección, aunque la posición de este CP no siempre es una guía real de la localización de la placa metafásica (Silva *et al.*, 1999). Para la inyección, el CP se sitúa a las 6 ó 12 horarias realizando la inyección a las 3 horarias. Hay estudios que demuestran que aunque no haya diferencias en el porcentaje de supervivencia y fecundación relacionado con la posición del CP, se ha observado que afecta a la calidad embrionaria, resultando embriones con menor grado de fragmentación cuando el corpúsculo se sitúa a las 6 horarias (Nagy *et al.*, 1995).

⇒ Otro importante factor para el éxito de la técnica parece ser el minimizar la exposición de los ovocitos a las condiciones ambientales externas (Kane *et al.*, 2003).

En 2003, Yong *et al.* propusieron un método modificado para la inyección de espermatozoides en el cerdo utilizando pipetas de 3-4 $\mu$ m de diámetro, inferior a la cabeza del espermatozoide porcino, de manera que

esta cabeza queda fuera de la pipeta durante la inyección. Además, utilizaron polivinilalcohol (PVA) en vez de la PVP en el medio de inyección. Al mismo tiempo demostraron similares porcentajes de formación pronuclear, inyectando los espermatozoides con un protocolo diferente al habitual en el que se dispone el espermatozoide en la pipeta a través de la cabeza, a diferencia del protocolo actual que introduce primero la cola.

#### 1.2.2.1.4 Fallos en la activación del ovocito

Existen diversas etiologías asociadas a fallos en la activación del ovocito durante la ICSI. Tesarik y Mendoza en 1999 estudiaron los diferentes patrones de oscilaciones de calcio que se producen durante la fecundación normal y durante la ICSI en la especie humana. Estos autores, observaron que la activación del ovocito en la ICSI sugiere un mecanismo de dos etapas. La primera consiste en un pseudo desencadenamiento (*pseudotrigger*), que tiene lugar durante la inyección, donde se produce una entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  proveniente del medio que rodea al ovocito, siendo este incremento de  $\text{Ca}^{+2}$  similar al que se produce durante la fusión del espermatozoide al ovocito en condiciones normales. La segunda etapa se caracteriza por el patrón de oscilaciones de  $\text{Ca}^{+2}$ , resultante de la liberación del factor espermático en el citoplasma del ovocito. No se puede producir una correcta liberación y activación de este factor si la primera etapa no ha producido el incremento de calcio adecuado.

De esta manera, los fallos que se producen en la activación del ovocito pueden explicarse por fallos en la función de pseudodesencadenamiento o por fallos en la función oscilatoria. Los primeros ocurren debido a una entrada insuficiente de  $\text{Ca}^{+2}$  al interior del ovocito, en medios con baja concentración de calcio, cuando la ICSI se realiza demasiado rápida o cuando no se realiza la aspiración del citoplasma del ovocito que nos permita la ruptura de la membrana plasmática (Tesarik y Mendoza, 1999). Un desencadenamiento insuficiente no permite una función normal del factor espermático que dará lugar a las oscilaciones. Estas oscilaciones son necesarias para completar la segunda división meiótica, descondensación de la cabeza espermática y posterior formación pronuclear. Por otra parte, los fallos debidos a la función oscilatoria son inherentes al espermatozoide o a un retraso en la liberación del factor espermático (por insuficientes tratamientos espermáticos que permitan

alteración de la membrana plasmática del espermatozoide previo a la ICSI). De esta manera se produce un primer incremento en la concentración de calcio (debido al proceso de inyección), pero no se efectúan las correspondientes oscilaciones dando lugar a fallos en la activación o a una incompleta activación del ovocito (Tesarik y Mendoza, 1999).

Los fallos en la activación ovocitaria se reflejan en la persistencia de la MII y la presencia de la cromatina espermática en forma compacta.

#### 1.2.2.1.5 *Uso de agentes activadores*

Para solventar los fallos durante la activación del ovocito, en cerdos, diversos autores han estado utilizando métodos para producir la activación artificialmente, sobre todo con el uso de ovocitos madurados *in vitro*, donde se ha visto la necesidad de esta activación para poder obtener buenos resultados de fecundación y desarrollo embrionario (Di Berardino *et al.*, 2000; Kolbe y Holtz, 2000; Lai *et al.*, 2001; Nakai *et al.*, 2003).

Entre los diferentes tratamientos de activación ovocitaria en la ICSI porcina se han estado utilizando pulsos eléctricos (Kim *et al.*, 1998, 1999), tratamiento de los ovocitos con ionóforo de calcio (Kolbe y Holtz, 1999; Di Berardino *et al.*, 2000), inyección de calcio (Catt *et al.*, 1997) o etanol (Di Berardino *et al.*, 2000).

Kolbe y Holtz (1999) compararon los porcentajes de división mediante el tratamiento de los ovocitos madurados *in vitro* con diferentes concentraciones de ionóforo de calcio (0, 50 y 100 $\mu$ M) 5 minutos después de la inyección y observaron que el porcentaje de división estaba relacionado con la concentración de este ión. Di Berardino *et al.* (2000) muestran que si se utilizan ovocitos madurados *in vitro* es necesaria una activación exógena para el desarrollo embrionario y esa activación es mejor con ionóforo de calcio que con etanol. Otros autores sugieren que inyectando calcio conjuntamente con el espermatozoide puede incrementarse el porcentaje de fecundación de un 32% a un 63% (Catt *et al.*, 1997).

Se ha realizado un estudio mediante la inyección de ovocitos madurados *in vitro* a partir de la maduración de folículos preantrales obteniendo unos resultados de 64% de fecundación, 51% de división y un 21% de blastocistos sin necesidad de activación ovocitaria, pero no reportan ningún nacimiento (Wu *et al.*, 2001). Otros autores obtienen resultados similares sin el uso de agentes activadores (Katayama *et al.*, 2002a, 2002b; García-Roselló, 2003).

#### 1.2.2.1.6 Producción de descendencia viva

Se ha obtenido descendencia viva mediante ICSI en diferentes especies. En ratones, Lacham-Kaplan *et al.* lo consiguieron en 1995. En conejos, Hosoi *et al.* (1993) obtuvieron una camada inyectando espermatozoides intactos en el citoplasma de ovocitos madurados *in vivo*. En vacuno, Goto *et al.* (1990) obtuvieron descendencia viva mediante ICSI de espermatozoides muertos. Los ovocitos fueron sometidos a un tratamiento con ionóforo de calcio para inducir la activación. También se ha obtenido descendencia viva en la especie ovina (Catt, 1996), felina (Pope, 1998), y equina (Grondahl *et al.*, 1997).

La obtención de lechones viables mediante esta técnica de fecundación es todavía extremadamente baja y únicamente 4 grupos de investigación han obtenido nacimientos de lechones vivos. Dentro de estos grupos de investigación, sólo uno de ellos utilizó ovocitos madurados *in vitro*. Los primeros lechones obtenidos fueron en el 2000 (Kolbe y Holtz, 2000; Martin, 2000) con ovocitos madurados *in vivo*. Kolbe y Holtz necesitaron de la activación ovocitaria con el ionóforo de calcio, mientras que Martin no utilizó tratamientos exógenos. Estos experimentos demuestran que la activación ovocitaria exógena puede ser opcional en el desarrollo de embriones procedentes de la inyección de ovocitos madurados *in vivo*.

Posteriormente, en 2001, Lai *et al.* obtuvieron el primer lechón (muerto al nacer) procedente de la inyección de ovocitos madurados *in vitro* y para ello fue necesaria la activación mediante pulsos eléctricos, observando que el porcentaje de blastocistos se asemejaba al obtenido con ovocitos madurados *in vivo*. Estos autores concluyen que los ovocitos madurados *in vitro* necesitan activación exógena para el desarrollo

embrionario, proponiendo la activación eléctrica como un medio apropiado para producir estos embriones.

Probst *et al.* en 2002 obtuvieron 13 lechones en dos camadas procedentes de la inyección de espermatozoides sexados y ovocitos madurados *in vivo*, en los que la activación se estimuló mediante la inyección de  $\text{ClCa}_2$ .

Recientemente, en 2003, otro grupo de investigación publica el nacimiento de tres lechones mediante la utilización de ovocitos madurados *in vitro* y activados mediante pulsos eléctricos (Nakai *et al.*, 2003).

Son necesarias nuevas investigaciones que abarquen los diferentes aspectos relacionados con la producción *in vitro* de embriones porcinos, dentro de la cual se encuentran la MIV/ICSI/CE y transferencia embrionaria (TE) y establecer las condiciones necesarias para la estandarización del proceso y poder obtener un método que nos permita la producción de un número de embriones viables adecuado y, como consecuencia, un número aceptable de lechones.

## **1.3 DESARROLLO EMBRIONARIO**

### **1.3.1 DESARROLLO IN VIVO**

Después de la etapa de cigoto, los embriones experimentan varias divisiones mitóticas. Durante los primeros estadios de la gestación, las interacciones materno-embriónicas en la especie porcina son de gran importancia debido a que el período preimplantacional es bastante prolongado. Esta interacción queda patente en la sincronía necesaria entre el estadio del embrión y del útero durante la transferencia de embriones.

#### **1.3.1.1 Segmentación o división embrionaria**

Como hemos detallado en el apartado anterior, la fecundación tiene lugar en la unión ampular-ístmica del oviducto. Poco después de la fecundación, el cigoto comienza a dividirse a la vez que va recorriendo el



oviducto hacia el útero, esto último facilitado por la acción de los esteroides. Los cigotos sufren la primera división celular aproximadamente a las 17-19h tras la ovulación (Hunter, 1974). Los embriones mantienen el estadio de 2 células durante 6-8h mientras que el estadio de 4 células se prolonga durante 20-24h (Flint, 1981), por lo que la mayoría de embriones entran en este estadio en el útero (Davis; 1985). Durante este proceso, la división se produce sin que aumente la masa celular, a diferencia de las mitosis de las células somáticas.

Durante la permanencia de los cigotos-embryones en el oviducto, éstos se ven influenciados por secreciones propias del oviducto 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).

El oviducto participa activamente en el mantenimiento y preparación de los ovocitos para la fecundación y la división celular posterior. El fluido oviductal (FO), está constituido principalmente por una mezcla de sustancias derivadas del plasma sanguíneo, a través de la trasudación selectiva. El fluido está compuesto por proteínas, enzimas, aminoácidos, compuestos energéticos, hormonas y electrolitos (Romar, 2003) y varía según las fases del ciclo ovárico. Los factores endocrinos son importantes en el desarrollo temprano de los embriones en el oviducto.

Los embriones porcinos en estadio de 4 células se desarrollan en el útero (Stroband y Van der Lende, 1990) y se nutren a partir de las secreciones de la denominada leche uterina, que es producida por influencia de la progesterona. Por otra parte, es posible que los embriones cambien el microambiente uterino al liberar esteroides hacia el útero. Estos esteroides actuarían sobre la permeabilidad vascular local y sobre la liberación de proteínas endometriales. Además, el fluido uterino de los mamíferos parece ser que contiene factores estimulantes e inhibidores de la síntesis de ADN embrionario (Flint, 1981).

El estadio de morula (8-16 células) en la especie porcina se alcanza alrededor del día 4, tomando como día 0 el momento de la ovulación (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 se elongan en el estadio de mórula, lo que sugiere un incremento en su actividad metabólica. Los nucleolos se observan a partir de estadio de 8 células y éstos se asocian a un incremento en el número de ribosomas.

Todos estos cambios en la síntesis y modificación de proteínas nos indican que se está produciendo la activación del genoma embrionario, el punto a partir del cual el genoma del embrión comienza a ser transcripcionalmente activo y pasa a controlar el desarrollo embrionario (Exley y Carol, 1999). Esta activación varía según las especies; así, en el ratón tiene lugar en estadio de 2 células, mientras que en embriones ovinos tiene lugar en 8-16 células. En cerdos, este inicio en la síntesis de ARN comienza en estadio de 4 células (Freitag *et al.*, 1998). En las etapas anteriores, el desarrollo estaba condicionado por proteínas y ARN maternos, sintetizados y almacenados de forma inactiva por el ovocito (Exley y Carol, 1999). El bloqueo en el estadio de 4 células, uno de los principales obstáculos en el cultivo *in vitro* de embriones, corresponde al momento de la activación del genoma embrionario.

### **1.3.1.2 Formación del blastocisto**

Tan pronto como el embrión llega a 16 células (dependiendo de la especie), las blastómeras empiezan a formar uniones estrechas unas con otras adoptando una forma circular ligeramente lobulada denominada mórula. En este estadio es difícil contar el número de células. Cuando la mórula está formada, las blastómeras empiezan a separarse en 2 poblaciones distintas: las células internas y las externas. Las células de la posición interna desarrollan uniones tipo *gap*, que por un lado permiten la comunicación intercelular y, por otro, van a mantener agrupado a este conjunto celular. Las células externas van a desarrollar uniones estrechas u ocluyentes "*Tight junctions*", que se producen para modificar las características de permeabilidad. Después de que se hayan formado las uniones estrechas, los fluidos empiezan a acumularse en el interior del embrión. Este acúmulo de fluido se debe a la acción de la bomba de sodio, la cual introduce iones al interior de la mórula; al aumentar la concentración de éstos, el agua difunde hacia el interior y comienza a formarse la cavidad o blastocele en la masa de células. Esta etapa, en la que el embrión aún se encuentra rodeado por la ZP, recibe el nombre de blastocisto y en él se

diferencian según su posición dos poblaciones de células: una interna (masa celular interna) que dará origen al embrión propiamente dicho, y otra, la situada periféricamente, que origina el trofoectodermo o trofoblasto, que interviene en la ingestión selectiva de nutrientes y formará posteriormente el corion (Hafez, 2000). Las células del trofoblasto tienen permeabilidad selectiva, lo cual favorece el transporte de agua y sodio que contribuye a la formación del blastocele.

En el cerdo, las primeras señales de compactación ocurren en el día 4, en el estadio de 8 células (Hunter, 1974). La diferenciación entre las células o blastómeros interiores o exteriores 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 formación del blastocele es normalmente de 16-32 (Papaioannou y Ebert, 1988).

### **1.3.1.3 Eclosión del blastocisto**

Antes de la eclosión, los blastocistos sufren un fenómeno de expansión ocupando la totalidad del espacio perivitelino, pasándose a denominar blastocisto expandido. La media de células en los blastocistos porcinos expandidos es de 65-120.

Entre el día 6-7 se produce la rotura de la ZP y la salida del embrión por el punto de rotura. Este proceso parece ser independiente del número de células por blastocisto, al menos en estudios *in vitro* (Niemann *et al.*, 1983). Entre las causas de rotura se encuentran el crecimiento y expansión del blastocisto, el aumento de líquido en el blastocele, las contracciones rítmicas del embrión que se producen como consecuencia de ambos factores y otras causas, variables según la especie, como la producción de una lisina por el epitelio uterino, cambios en la integridad de la zona por factores enzimáticos producidos por el útero o el embrión, o la exposición al ambiente uterino sensibilizado por los estrógenos.

Los blastocistos porcinos, en el momento de la eclosión contienen prostaglandina E (Stone *et al.*, 1986) que podría estar implicada en la regulación del transporte del agua colaborando en la rotura de la ZP.

El blastocisto eclosionado, o blastocisto que se ha desprendido de la ZP, comienza una fase de alargamiento y rápido crecimiento, pasando de una forma esférica a una tubular o filamentosa. El diámetro del blastocisto recién eclosionado es de 0.2mm aproximadamente. El momento en el que esto ocurre es variable según las especies y coincide con la migración uterina, o etapa en la que los embriones se mueven en el útero en busca de un lugar adecuado para implantarse. Paralelamente ha tenido lugar la diferenciación de las hojas blastodérmicas (ecto, meso y endodermo) a partir del nódulo embrionario. Tras la eclosión, los blastocistos porcinos permanecen en el útero hasta el día 13 (Dantzer, 1985).

Los embriones porcinos empiezan a adherirse a la superficie uterina el día 13, finalizando la adhesión a través de la superficie trofoblástica entre los días 18 a 24.

#### **1.3.1.4 Reconocimiento maternal de la gestación**

En la mayoría de las especies domésticas, tiene que surgir una señal en las etapas tempranas de la gestación para informar que ésta sea mantenida y no se inicie un nuevo ciclo estral. Más específicamente, la concentración de progesterona en la sangre materna tiene que permanecer en niveles elevados, de forma que el endometrio mantenga las condiciones adecuadas que garanticen la supervivencia del embrión.

En el cerdo, la producción de estrógenos por el embrión en desarrollo es la señal para el reconocimiento materno de la gestación (Geisert *et al.*, 1990). Períodos de producción de estrógenos entre los días 11 y 12 y los días 14 al 30 de gestación permiten el mantenimiento del cuerpo lúteo.

El mantenimiento de la gestación en el cerdo es dependiente de un mínimo de ocupación fetal en el útero. Son críticos aproximadamente los días 11 y 12 de gestación, cuando los estrógenos derivados del embrión son los responsables del reconocimiento maternal de la gestación (Geisert *et al.*, 1990). Durante este período, son necesarios como mínimo de 4 a 5 embriones viables (Polge *et al.*, 1996) o al menos un 50% de ocupación uterina (Geisert *et al.*, 1990) para el mantenimiento de la gestación. Este requerimiento termina alrededor del día 14, a partir del cual el número de

embriones necesarios es menos crítico (Dzuik, 1985). De esta manera, un número inferior a 4 embriones es incapaz de sobrepasar completamente la influencia luteolítica normalmente ejercida por un útero no gestante.

### **1.3.2 CULTIVO DE EMBRIONES (CE) IN VITRO**

#### **1.3.2.1 Problemática actual en la especie porcina**

El limitado desarrollo de los embriones hasta estadio de blastocisto y su menor calidad en comparación a los obtenidos *in vivo*, no se debe a un fallo puntual en el sistema de producción *in vitro* de embriones, sino a una combinación de determinados factores como una inadecuada o incompleta maduración citoplasmática, una inadecuada formulación de los medios de cultivo y unas condiciones de cultivo subóptimas. En los sistemas de FIV porcina, además de los factores mencionados anteriormente, se suma la polispermia. Con la ICSI, este fallo se minimiza, y sin embargo los cigotos resultantes de esta técnica dan lugar a un número muy bajo de blastocistos (Klocke, 1999). Se conocen posibles etiologías asociadas a este bajo desarrollo embrionario. Entre éstas podemos destacar las siguientes:

⇒ Fallos en el medio de cultivo de embriones. Varios trabajos realizados con la técnica de la ICSI muestran también baja capacidad de formación de blastocistos, tanto en ovocitos madurados *in vivo* (Martin, 2000) como en ovocitos madurados *in vitro* (Klocke, 1999; Kolbe y Holtz, 1999; Probst y Rath, 2003), indicando la posibilidad de fallos en el medio y condiciones de cultivo de embriones.

⇒ Fallos durante el proceso de maduración *in vitro*. Aunque los ovocitos son capaces de completar la meiosis *in vitro*, solo un porcentaje pequeño son capaces de continuar su desarrollo hasta blastocisto. Según algunos autores esto podría indicar que el proceso de maduración *in vitro* (MIV) no es del todo normal (Klocke, 1999; Probst y Rath, 2003). Diversos estudios comparan el uso de ovocitos madurados *in vivo* frente a los madurados *in vitro* durante la realización de la ICSI, obteniéndose mejores resultados con los primeros (Kolbe y Holtz, 1999; Probst y Rath, 2003). De

igual manera se han obtenido mayor número de lechones mediante esta tecnología y el uso de ovocitos madurados *in vivo* (Probst y Rath, 2003).

⇒ Fallos en la activación ovocitaria. Aunque los ovocitos se activen y sean capaces de formar pronúcleos, puede haber deficiencias en este sistema de activación. Diversos estudios han demostrado una necesidad de activación exógena para que el ovocito inyectado sea capaz de continuar su desarrollo embrionario (revisado en el apartado de activación).

### **1.3.2.2 Condiciones de cultivo**

Las condiciones más utilizadas en la incubación de los embriones *in vitro* son prácticamente las mismas que las utilizadas para la MIV y la FIV; un 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera saturada de humedad y una temperatura de 38.5-39°C.

La relación **embriones/volumen** de medio también ha sido objeto de estudio. En la actualidad, los embriones se cultivan en excesivos volúmenes de medio de cultivo a pesar de que en condiciones *in vivo* se observan cantidades únicamente de 1.5-2.0nl (y en el oviducto probablemente cantidades de picolitros). Una de las hipótesis propuestas para el efecto beneficioso del cultivo en grupo y/o en un pequeño volumen de medio es la producción de factores autocrinos y/o paracrinos por parte del embrión en el cultivo (O'Neill, 1998), que estimularían el desarrollo del propio embrión que los genera y el de los embriones vecinos. De esta manera, el cultivo en volúmenes grandes daría lugar a la dilución de estos factores, de tal modo que la concentración no sería la adecuada para ejercer el efecto (Gardner, 1994). Entre estos posibles factores se han descrito los siguientes: factores de crecimiento con propiedades mitogénicas o de diferenciación PDGF (*Platelet-derived Growth Factor*; Thibordeaux *et al.*, 1995), factores anti-apoptóticos o de supervivencia, como el TGFβ (*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.

### 1.3.2.3 Medios de cultivo y suplementos

Los embriones de los mamíferos (como el ganado vacuno, ovino y porcino) difieren radicalmente en el grado de crecimiento preimplantatorio de otros animales como ratones y otras especies de laboratorio. El embrión de 1 célula de ratón contiene aproximadamente 20ng de proteínas al igual que en el estadio de blastocisto preimplantatorio (Kane, 2003); por lo tanto, la fase de crecimiento anterior al estadio implantatorio es mínima o prácticamente inexistente. Sin embargo, el embrión de vaca, al igual que el de cerdo, presenta alrededor de 132ng de proteínas en estadio de 2 células, alcanzando unos niveles de 185ng en el día 8 y de 900ng en el día 16 (Kane, 2003). Estas diferencias en el grado de crecimiento preimplantatorio repercuten en el cultivo de embriones. Por este motivo, es más fácil cultivar embriones de ratón durante un período de 3-4 días desde estadio de 1 célula hasta blastocisto en un medio simple sin presencia de aminoácidos, vitaminas o elementos traza; por el contrario, es más difícil obtener buenos blastocistos en animales de granja mediante tecnologías *in vitro*.

El contraste entre el limitado crecimiento y el pequeño incremento en el contenido de proteínas hasta estadio de blastocisto en vacas, ovejas y cerdos, y el gran incremento en crecimiento y contenido protéico después de la eclosión del blastocisto, nos indican los diferentes problemas de cultivo asociados al crecimiento temprano y al estadio de blastocisto.

Los primeros estudios de cultivo de embriones a partir de ovocitos madurados *in vivo* en la especie porcina, realizados por Davis en 1985, observaron un bloqueo en el estadio de 4 células. Este bloqueo coincide con la activación del genoma embrionario y es la etapa en la que el embrión pasa del oviducto al útero.

El cultivo *in vitro* de embriones porcinos ha experimentado avances considerables en los últimos años. Desde la extensa revisión llevada a cabo por Peters y Wells en 1993, las mejoras en los sistemas de cultivo podrían resumirse en tres aspectos. En primer lugar, el medio NCSU (Peters y Wells, 1993) es el medio más comúnmente empleado en los sistemas de cultivo de embriones, ya que es el medio con el que mayor porcentaje de blastocistos se ha obtenido (Machaty *et al.*, 1998). Lo que aún no se ha clarificado fehacientemente es la diferencia entre el uso del NCSU23 (Abeydeera *et al.*, 1998; Machaty *et al.*, 1998) y el NCSU37 (Hajdu *et al.*, 1994; Kikuchi *et al.*,

1999). Es necesario establecer si la taurina e hipotaurina del NCSU23 podría ser reemplazada por el sorbitol del NCSU37, o quizá sería mejor el uso de un medio con los tres suplementos. Estos componentes están asociados a diferentes aspectos fisiológicos y podrían tener efectos sinérgicos cuando se usan de manera conjunta. La taurina e hipotaurina actúan como osmorreguladores y estabilizadores del pH. Además, se ha descrito que la adición de taurina al medio incrementa el desarrollo embrionario (Peters y Wells, 1993) posiblemente debido a un efecto protector contra los daños peroxidativos (Guerin *et al.*, 1995). Por otra parte, el sorbitol, se sabe que en ratón presenta un efecto beneficioso en la compactación en estadio de mórula y expansión del blastocisto (Wells *et al.*, 1992).

Otra de las mejoras interesantes se basa en el efecto de la adición de suero a partir del día 5. Koo *et al.* en 1997 demostraron la necesidad de añadir suero en los estadios de mórula al medio NCSU para que produjera la eclosión del blastocisto. A pesar de que muchos grupos de investigación promueven el uso de medios químicamente definidos necesarios para una correcta estandarización entre los diferentes laboratorios (Iwasaki *et al.*, 1999), el suero fetal bovino (FCS: *Foetal Calf Serum*) inactivado a 56°C durante 30 minutos está siendo ampliamente utilizado como fuente proteica y de factores de crecimiento en los medios de CE. Debido al efecto bifásico de este suero, el desarrollo temprano es inhibido mientras que estimula la compactación de la mórula y la expansión del blastocisto (Lim *et al.*, 1994), por lo que debería ser añadido únicamente en el 5º día de cultivo. La concentración de FCS utilizado en la especie porcina varía entre laboratorios desde un 10% (Dobrinsky *et al.*, 1996) hasta un 20% (Koo *et al.*, 1997).

En tercer lugar, se podría utilizar cocultivos con células oviductales y endometriales para intentar mimetizar el cultivo *in vivo*, y de esta manera, proporcionar sustancias esenciales producidas por estas células. Estas sustancias no se incluyen en los medios químicamente definidos, debido a la falta de información sobre ellas (Rath *et al.*, 1995). En cerdos, se ha visto incrementada la monospermia mediante el uso de células oviductales (Nagai y Moor 1990; Romar *et al.*, 2001), incluso se han utilizado en la especie bovina dando buenos resultados (Katska *et al.*, 1998). Al mismo tiempo, se han realizado diversos estudios mediante el uso de células endometriales en la especie humana (Katsuragawa *et al.*, 1995), y en ratones (Soong *et al.*, 1998) donde se ha visto un incremento en el desarrollo embrionario. En la especie porcina, como ya hemos revisado en el apartado anterior, el cigoto



entra en el útero en el estadio de 2-4 células; esto significa que durante el desarrollo temprano, el embrión contacta en primer lugar con las células oviductales y posteriormente con las endometriales. Mediante el intento de mimetizar en lo máximo posible estas condiciones que se dan *in vivo*, se podría incrementar el número y calidad de blastocistos (Niemann y Rath, 2001).

Otro punto de estudio sería el uso de oviductinas. Las oviductinas son glicoproteínas sintetizadas en las células oviductales, que se unen a la ZP después de la ovulación (Kane, 2003). Es sabido que su función es cambiar las propiedades de la zona, dándole protección al embrión y posiblemente pueda afectar a su desarrollo posterior.

En relación al medio de cultivo post-inyección de los ovocitos porcinos, se están empleando comúnmente dos medios; por una parte el NCSU-23 (Kim *et al.*, 1998; Kolbe y Holtz., 1999; Lai *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1998, 2003) un medio típico de cultivo de embriones, mientras que otro grupo de investigación (Probst y Rath, 2003) utiliza un medio tradicional de FIV para las primeras 20h de cultivo y posterior transferencia a medio de CE. La diferencia entre ambos medios radica principalmente en la cantidad de calcio disponible.

El medio TALP formulado según describen Rath *et al.* (1999), al ser un medio de FIV, posee mayores cantidades de calcio (8mM en forma de lactato cálcico) que el NCSU-23 (1.70mM en forma de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), que además presenta en su composición taurina e hipotaurina. Se sabe que el calcio es un ion imprescindible en el proceso de activación ovocitaria y durante este proceso se van llenando los depósitos intracelulares mediante una captación de calcio extracelular. Además, en la composición de este medio se incluyen el piruvato (0.12mg/ml) y el lactato sódico (10mM). El piruvato y el lactato son dos fuentes de energía necesarias para los primeros estadios de desarrollo *in vitro* en la especie porcina (Kikuchi *et al.*, 2002). Se ha demostrado asimismo, que el piruvato es necesario para la respiración mitocondrial y la división celular durante el desarrollo preimplantacional en humanos (Wilding *et al.*, 2002). Además, el piruvato presenta capacidad antioxidante actuando como protector contra la citotoxicidad inducida por los peróxidos orgánicos en cultivos celulares renales y neuronales (Desagher *et al.*, 1997; Nath *et al.*, 1994). El lactato,

por su parte, incrementa el metabolismo del piruvato en embriones de ratón (Lane y Gardner, 2000).

Queda por dilucidar si una secuencia en el uso de medios de cultivo (primero uno específico de FIV, seguido de otro de CE) podría mejorar los resultados actuales de desarrollo embrionario *in vitro*.

#### **1.3.2.4 Morfología y calidad de los embriones**

Existen fallos durante el cultivo *in vitro* de los embriones que originan defectos en el sistema microtubular del ovocito. Se han llevado a cabo estudios comparativos de distribución de los filamentos de actina (responsable del mantenimiento de la placa metafásica, rotación de los cromosomas, liberación del corpúsculo polar, migración pronuclear y desarrollo de la mitosis celular), en embriones producidos *in vitro* mediante FIV e *in vivo*, donde se observaron diferentes patrones de distribución de estos filamentos intracelulares. Además, se vio fragmentación, presencia de blastómeras binucleadas y un menor número de células por blastocistos, en los embriones producidos *in vitro* a diferencia de los producidos *in vivo* (Wang *et al.*, 1999). Estos resultados demuestran que la baja capacidad de desarrollo de los embriones producidos *in vitro* parcialmente es debida a las subóptimas condiciones de cultivo.

#### **1.3.2.5 Valoración de la capacidad de desarrollo embrionario**

En relación a la valoración de los resultados anterior al desarrollo embrionario, ésta se realiza sobre las 18-20h después de la ICSI, cuando ya se ha alcanzado el estadio de desarrollo pronuclear. Los ovocitos con al menos un pronúcleo se consideran activados. Estadios con dos pronúcleos se clasifican como fecundados en los grupos inyectados con espermatozoide y partenogenéticos en los grupos inyectados sin espermatozoide (García *et al.*, 2003).

A las 48h de la ICSI se valora el número de divisiones celulares aunque no es un parámetro muy exacto debido a la gran inestabilidad de los ovocitos porcinos y a la tendencia a dividirse mediante fragmentación (Kolbe y Holtz, 1999). Resulta difícil distinguir sólo con criterios

morfológicos un embrión dividido correctamente y otro fragmentado o dividido partenogénicamente.

El parámetro más valorado en la capacidad de desarrollo embrionario en la mayoría de los laboratorios es el número de blastocistos obtenidos, así como el número de células por blastocisto, ya que se considera como un parámetro de calidad embrionaria.

Sin embargo, hemos revisado en este apartado, que el sistema de CE ocasiona alteraciones en el embrión. 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 a una hembra receptora. No obstante, tiene el inconveniente de ser una técnica de coste elevado por lo que no se realiza de manera rutinaria. Actualmente, el éxito alcanzado en las transferencias es muy variable y, como mucho, sólo el 20 ó 30% de los embriones sobrevive tras la transferencia (Abeydeera *et al.*, 2002), cuando los embriones proceden de FIV. En el caso de la ICSI, los porcentajes son muy inferiores (revisado en el apartado de ICSI).

#### **1.3.2.6 Transferencia de embriones**

En el cerdo, desde hace varias décadas se ha estado realizando la transferencia de embriones por vía quirúrgica. Sin embargo, en el campo relacionado con las aplicaciones comerciales sólo se ha utilizado de manera limitada debido a la necesidad de equipamiento, instalaciones adecuadas y anestesia. El éxito de la aplicación en la especie bovina de la recogida no quirúrgica de embriones y de la transferencia y técnicas relacionadas, ha estimulado el desarrollo de sistemas semejantes en el cerdo.

Hasta el momento, se han utilizado tres tipos de técnicas: 1) la transferencia quirúrgica clásica mediante laparotomía e introducción de los embriones en el oviducto o en el extremo del cuerno uterino dependiendo del estado de desarrollo, con porcentajes de gestación entre el 17 y el 100% y tamaños de camada entre 2.4 y 10.8 lechones (Cameron *et al.*, 1990); 2) la técnica de laparoscopia, con porcentajes de éxito que van del 14 al 90% y tamaños de camada de 7 a 9 lechones (Besenfelder *et al.*, 1998) y 3) los procedimientos no quirúrgicos, basados en el abordaje

transcervical y la introducción de los embriones en el útero a través de sondas especiales, que tienen la ventaja de no precisar sedación en los animales, no ser invasivos y ser repetibles indefinidamente en el mismo animal. Los porcentajes de gestación en este caso varían del 9 al 64% y el tamaño de las camadas de 3.1 a 10.9 lechones (Yonemura *et al.*, 1996; Hazeleger *et al.*, 2000). Recientemente se ha desarrollado una nueva sonda para transferencia embrionaria tanto en hembras nulíparas como en multíparas, que permite la introducción de los embriones por vía intrauterina profunda. Se ha obtenido también descendencia mediante esta sonda (Martínez *et al.*, 2004) con unos porcentajes de gestación (70%) similares a los obtenidos por transferencia quirúrgica y una media de 7 lechones por cerda.

La edad del embrión es un dato muy importante a la hora de realizar las transferencias; dependiendo del estadio en que se encuentre se dispondrán en oviducto o útero mimetizando las condiciones *in vivo*. Los mayores éxitos se han conseguido con la transferencia de embriones de 2-4 células en el oviducto o de blastocistos en el cuerno uterino y, mientras que en el primer caso, no es posible el abordaje transcervical, en el segundo sí es posible.

Otros factores a tener en cuenta son las condiciones higiénicas. El uso de antibióticos y material estéril para prevenir contaminaciones aporta mayor probabilidad de éxito al procedimiento (Yonemura *et al.*, 1996). En cuanto a la edad de las hembras, normalmente se utilizan hembras primíparas porque son más fáciles de manejar y toleran mejor la anestesia y los procedimientos quirúrgicos que las cerdas adultas. Por último, la sincronización o la misma procedencia de los embriones; los obtenidos por FIV o por ICSI no presentan la misma calidad inicial que los obtenidos *in vivo* como hemos explicado anteriormente.

Por otra parte, en la producción de descendencia viva juega un papel clave el reconocimiento y mantenimiento de la gestación. Al menos dos técnicas se están empleando para ayudar en el reconocimiento y mantenimiento de la gestación tras la transferencia de embriones cultivados *in vitro*. La primera es la administración exógena de estrógenos, los cuales actúan alterando la liberación de prostaglandinas del útero (Frank *et al.*, 1977). Estos estrógenos pueden administrarse a intervalos entre aproximadamente los días 11 y 15 de gestación (Geisert *et al.*, 1990). La

segunda técnica consiste en la inducción de cuerpos lúteos mediante la administración de eCG y hCG en el día 9 y el día 12 de gestación respectivamente (Ellicot *et al.*, 1973). Esta segunda población de cuerpos lúteos es refractaria a los efectos luteolíticos de la prostaglandina liberada alrededor del día 14 del ciclo estral original y proporciona una fuente continua de progesterona capaz de mantener la gestación (Bazer *et al.*, 1982).

## \_\_\_\_\_ **OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**

## 2

# OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Tras el análisis del estado actual de conocimientos realizado en el apartado anterior, nos planteamos como **objetivo general** en esta Tesis Doctoral contribuir de algún modo **a aumentar el rendimiento actual de la técnica de ICSI en la especie porcina**, abordando para ello parte de las distintas etiologías que se señalan como posibles causantes del bajo desarrollo embrionario (página 49 de la revisión bibliográfica).

Las etiologías que se han propuesto nos sirvieron para el planteamiento de nuestras **tres hipótesis** de trabajo:

1. Optimizando la secuencia de utilización de los medios de fecundación *in vitro* y de cultivo de embriones (FIV y CE) se puede mejorar el rendimiento de la técnica de ICSI en la especie porcina.
2. Mejorando el sistema de maduración *in vitro* del ovocito se puede aumentar el rendimiento de la técnica de la ICSI en la especie porcina.
3. Mediante la inyección InsP<sub>3</sub> junto con el espermatozoide se puede mejorar la activación ovocitaria, y con ello, el porcentaje final de blastocistos que se obtienen tras la ICSI en la especie porcina.

Para la aceptación o rechazo de cada una de las hipótesis fue necesario el planteamiento de una serie de objetivos específicos:

**1. Optimizando la secuencia de utilización de los medios de fecundación *in vitro* y de cultivo de embriones (FIV y CE) se puede mejorar el rendimiento de la técnica de ICSI en la especie porcina.**

La mayoría de los investigadores transfieren los ovocitos recién inyectados a un medio de cultivo de embriones como es el NCSU-23 (revisado en página 56). Sin embargo, en condiciones *in vivo*, el cigoto recién fecundado se encuentra en el ambiente oviductal, muy diferente del ambiente uterino al que se desplaza con posterioridad (48 horas post-ovulación, estadio de 2-4 células). Por lo tanto, el desarrollo embrionario *in vitro* podría mejorar si los ovocitos recién inyectados se transfieren a un medio con las características de los medios de FIV (TALP), en los cuales tiene lugar la penetración del espermatozoide y el desarrollo pronuclear, como ocurre en el oviducto, y posteriormente a un medio de cultivo de embriones (NCSU-23), capaz de aportar los nutrientes necesarios para soportar las primeras divisiones celulares, como ocurre en el útero. Sería importante, además, determinar el periodo de tiempo óptimo de permanencia de los ovocitos inyectados en el medio de FIV, ya que al eliminar etapas como la unión espermatozoide-zona pelúcida, el paso a través de ésta, la unión del gameto masculino a la membrana plasmática del ovocito, la fusión y posterior penetración espermática, es posible que el tiempo necesario para la formación de los pronúcleos se acortara con respecto al observado *in vivo* o mediante FIV convencional. En consecuencia, el primer objetivo específico de esta Tesis consistió en comprobar si el rendimiento de la técnica de ICSI mejora cuando los ovocitos son cultivados durante las primeras horas post-inyección (6h ó 20h) en un medio de FIV y posteriormente son transferidos a un medio de CE con respecto a un grupo control que directamente se transfiere al medio de CE. Los grupos de trabajo que elegimos para conseguir este objetivo se detallan en el apartado de diseño experimental.

**2. Mejorando el sistema de maduración *in vitro* del ovocito se puede aumentar el rendimiento de la técnica de la ICSI en la especie porcina.**

Durante la maduración *in vitro*, ovocitos que fisiológicamente no están destinados a ser ovulados en un periodo de tiempo inferior a 44 horas, son extraídos de sus folículos y cultivados hasta que alcanzan el



estadio de MII, indicador de la maduración nuclear. Sin embargo, se les priva de una importante etapa de diferenciación y maduración citoplasmática durante la cual, en el interior del folículo, adquieren la competencia para el posterior desarrollo embrionario temprano. Numerosos autores han planteado la hipótesis de que con el uso de inhibidores meióticos es posible cultivar ovocitos detenidos en estadio de GV durante un tiempo limitado, y posteriormente someterlos a maduración *in vitro*, permitiendo de este modo que la maduración citoplasmática y la capacidad de desarrollo embrionario mejoren (revisado en páginas 26-27). Nuestro **segundo objetivo específico** consistió en estudiar el efecto del precultivo en roscovitina, un inhibidor meiótico, sobre los resultados de la ICSI en la especie porcina, analizando para ello diversos indicadores de maduración nuclear, maduración citoplasmática, fecundación y desarrollo embrionario de los ovocitos precultivados en presencia de roscovitina. Además, dentro de esta misma hipótesis, nos planteamos un **tercer objetivo específico** para averiguar si el precultivo en roscovitina afectaba al tiempo requerido para la posterior reanudación de la meiosis *in vitro* y, consecuentemente, a la capacidad de desarrollo embrionario temprano.

**3. Mediante la inyección  $\text{InsP}_3$  junto con el espermatozoide se puede mejorar la activación ovocitaria, y con ello, el porcentaje final de blastocistos que se obtienen tras la ICSI en la especie porcina.**

Numerosos autores han empleado diversos agentes para imitar *in vitro* las oscilaciones de  $\text{Ca}^{+2}$  responsables de la activación del ovocito. Debido a que los embriones obtenidos mediante ICSI en la especie porcina cesan muy tempranamente en sus divisiones y no alcanzan el estadio de blastocisto, se supone que la inyección del espermatozoide por sí sola representa un estímulo insuficiente para que el ovocito comience y continúe la secuencia de acontecimientos que supone el proceso de activación, hasta llegar al estadio de blastocisto. Por esta razón, nuestro **cuarto objetivo específico** consistió en comprobar si la inyección de  $\text{InsP}_3$  junto al espermatozoide estimulaba el proceso de activación ovocitaria mejorando el porcentaje final de blastocistos obtenido.

