
DISCUSIÓN

5

DISCUSIÓN

En la actualidad, existe un considerable interés por producir grandes cantidades de ovocitos (mediante técnicas de maduración *in vitro*, MIV) y de embriones (mediante fecundación *in vitro*, FIV) en la especie porcina con el propósito de avanzar en la investigación básica y biomédica. Debido a su similitud biológica con el hombre, el cerdo ha llegado a ser cada vez más importante como potencial donador de órganos para xenotrasplantes y como animal transgénico para producir proteínas específicas. Los intentos para clonar y producir cerdos transgénicos mediante inyección pronuclear requieren ovocitos maduros y cigotos, respectivamente. Sin embargo, la obtención quirúrgica de ovocitos y embriones a partir de animales donantes es costosa económicamente, necesita una gran inversión de tiempo y la cantidad de material biológico obtenida es escasa. Por este motivo, la utilización eficaz de ovarios procedentes de matadero para producir ovocitos maduros y embriones mediante técnicas *in vitro* es crucial (Abeydeera, 2002).

El objetivo general de este estudio fue, como ya se ha indicado, aumentar el rendimiento de la producción *in vitro* de embriones porcinos, que con la metodología actualmente utilizada apenas llega a un 15%. Para conseguirlo, nuestro primer paso consistió en buscar en las fuentes bibliográficas las posibles causas de este bajo rendimiento e intentar solventarlas. Entre los factores que afectan al proceso, nos encontramos básicamente con las complicaciones asociadas a la maduración *in vitro* de los ovocitos, a la polispermia y a las inadecuadas condiciones de cultivo embrionario. Mediante la introducción de la técnica de ICSI, el inconveniente de la polispermia queda solucionado, ya que un único espermatozoide se introduce en el interior del ovocito. Sin embargo, el

porcentaje de blastocistos que se obtienen tras el cultivo de los cigotos, ya de por sí bajo mediante la FIV tradicional, se ve drásticamente disminuido después de la ICSI. Las razones para explicar este fracaso pueden encontrarse, al menos parcialmente, en la propia técnica de ICSI, y en este caso los problemas inherentes a esta metodología no pueden ser evitados en su totalidad (daños en la membrana plasmática del ovocito, disrupción del sistema microtubular por el efecto mecánico de la inyección, etc...). Sin embargo, sí podemos trabajar sobre las causas relacionadas con el propio ovocito, con el espermatozoide o con el cigoto. En relación al factor espermático, durante la técnica de la ICSI se introduce el espermatozoide en el ovocito con la totalidad de sus membranas, a diferencia de lo que ocurre durante la fecundación fisiológica. Este factor ya fue estudiado con anterioridad en nuestro laboratorio, utilizando espermatozoides frescos frente a congelados tratados bajo diferentes condiciones, observándose diferencias principalmente en cuanto al verraco utilizado y en cuanto al método de conservación empleado. Si embargo, el porcentaje de blastocistos aumentó únicamente para uno de los verracos utilizados (García-Roselló, 2003). Por este motivo, en el presente trabajo decidimos centrarnos en el ovocito y en el cigoto como objetos de estudio, tratando de aumentar su capacidad o competencia de desarrollo. Para ello, intentamos en primer lugar optimizar la secuencia de utilización de los medios de fecundación *in vitro* y de cultivo de embriones (FIV y CE) que emplean la mayoría de los laboratorios que trabajan en esta especie. En segundo lugar, intentamos mejorar el sistema de maduración *in vitro* del ovocito mediante la introducción de inhibidores de la meiosis, como es el caso de la roscovitina, y valoramos el desarrollo embrionario *in vivo* de los cigotos obtenidos por ICSI bajo estas condiciones. Dentro de este mismo apartado, estudiamos el tiempo óptimo de maduración *in vitro*, tomando tres tiempos de MIV comúnmente utilizados (36, 40 y 44h). Por último, para verificar si el problema estaba en la necesidad del cigoto de ser estimulado en el momento de la ICSI para favorecer las oscilaciones de calcio, se estudió el efecto del InsP_3 sobre el desarrollo embrionario *in vitro*.

5.1 EFECTO DEL TIEMPO DE CULTIVO EN MEDIO TALP SOBRE LOS PARÁMETROS DE ICSI Y DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO*.

En los últimos años, con el auge experimentado por las técnicas de clonación, se ha vuelto a poner de manifiesto la ineficacia de los medios de

cultivo *in vitro* para el desarrollo de los cigotos de la mayoría de las especies de mamíferos. Por este motivo, numerosos grupos han trabajado en la identificación de los factores presentes en los medios de cultivo que tienen un efecto beneficioso o nocivo sobre la activación del genoma embrionario, la capacidad de división de los blastómeros, la eclosión del blastocisto, etc. Entre otras conclusiones, junto al ya conocido efecto bifásico del suero, inhibiendo las primeras divisiones, pero estimulando la compactación de la mórula y la formación del blastocisto (Lim *et al.*, 1994), se ha observado que este aditivo, tan comúnmente empleado como fuente proteica, reduce la criotolerancia de los blastocistos y altera los patrones de expresión de ARNm (Rizos *et al.*, 2002). Por otra parte, cuanto más se ha profundizado en el conocimiento de los microambientes oviductal y uterino, en los que los cigotos experimentan sus primeras divisiones *in vivo* hasta que alcanzan el estadio de blastocisto y eclosionan, más parece existir un acuerdo común en la necesidad del uso de medios secuenciales, en los que los componentes van cambiando al mismo tiempo que lo hacen los requerimientos del embrión en desarrollo. Por citar un ejemplo, se han diseñado medios de cultivo en diferentes especies que suprimen la glucosa durante el periodo de pre-compactación y la añaden durante el periodo post-compactación, basándose en el hecho de que la producción de ATP en las primeras etapas de desarrollo es muy baja y de que concentraciones altas de glucosa en estos estadios pueden resultar tóxicas para el embrión (Jiménez *et al.*, 2003).

En la especie porcina, el medio NCSU-23 (Petters y Reeds, 1991) es el más ampliamente utilizado para el cultivo de embriones. En nuestro estudio, se empleó con todas las modificaciones que se han ido incorporando sucesivamente según se ha ido avanzando en el conocimiento de las necesidades del embrión. Así, contiene albúmina libre de ácidos grasos pero no suero, insulina como factor de crecimiento, aminoácidos esenciales y no esenciales, y glucosa, entre otras sustancias. Para conseguir mejorar el porcentaje de blastocistos obtenidos *in vitro* tras el cultivo de los cigotos producidos por ICSI, nos planteamos diseñar un experimento en el que pudiéramos comprobar si la transferencia directa de los cigotos a este medio de cultivo, que ha sido empleada por diversos investigadores (Kim *et al.*, 1998; Kolbe y Holtz., 1999; Lai *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1998, 2003), podría ser una de las causas del bajo rendimiento final obtenido. Según nuestra hipótesis, el hecho de que la técnica de ICSI suprima pasos de la fecundación relativos al reconocimiento entre los gametos, la unión

espermatozoide-zona pelúcida, la inducción de la reacción acrosómica o la fusión con el oolema, no significa que un cigoto recién inyectado se encuentre ya en estadio pronuclear o que sus requerimientos de cultivo equivalgan a los de un embrión en estadio de dos células. Por ello, decidimos comparar el efecto de las horas de cultivo en medio TALP, antes de la transferencia a medio NCSU-23, sobre los resultados de desarrollo embrionario. En el medio TALP se produce la formación pronuclear en los sistemas de fecundación tradicional (Coy *et al.*, 2002, Matás *et al.*, 2003) y tras un periodo de tiempo variable entre 6 y 20 horas, los cigotos se transfieren a medio NCSU. Sin embargo, en nuestra revisión de la bibliografía no encontramos referencias que estudiaran la secuencia idónea de tiempo de cultivo entre el medio TALP y el NCSU de los ovocitos porcinos recién inyectados, aunque existen datos que indican que la formación pronuclear tiene lugar durante las seis primeras horas tras la inyección del espermatozoide (Lee *et al.*, 2002).

Según nuestra hipótesis, puesto que durante las seis primeras horas tras la inyección espermática tiene lugar la formación pronuclear, la presencia de los cigotos en este medio de FIV rico en calcio, lactato y piruvato, podría favorecer este evento y por lo tanto el desarrollo embrionario posterior. Además, también podría resultar beneficioso mantener a los cigotos en este medio durante un periodo más largo (20h), dando tiempo a que se produzcan las primeras divisiones embrionarias como ocurre en el oviducto, antes de transferirlos al medio NCSU-23.

Los resultados obtenidos confirmaron parcialmente nuestra hipótesis, ya que aquellos cigotos que estuvieron durante 6 ó 20 horas en medio TALP alcanzaron el estadio de dos células más rápidamente que los que se transfirieron directamente a medio NCSU-23. El hecho de que a las 22 horas postinyección ya comenzaran a observarse las primeras divisiones en los cigotos que habían sido cultivados en TALP nos indica que posiblemente la viabilidad de estos embriones sea mayor, a pesar de que en los porcentajes de blastocistos, valorados a los 7 días, las diferencias encontradas no resultaran significativas. Como ha sido previamente demostrado, el momento en el que ocurre la primera división es un importante indicador de la capacidad de desarrollo ulterior (Lonergan *et al.*, 1999). Una explicación alternativa sería la que se ha postulado en relación a que el desarrollo perimplantacional de los embriones macho es más rápido que el de los embriones hembra cuando la glucosa está presente en el

medio (Larson *et al.* 2001), como es nuestro caso. Sin embargo, bajo las condiciones de nuestro estudio, esta posibilidad no explicaría las diferencias encontradas, ya que la concentración de glucosa en el TALP y en el NCSU-23 fue la misma.

En cuanto al resto de los parámetros evaluados, en los que no se observaron diferencias entre los tres grupos experimentales empleados, nos resultan útiles para valorar la bondad de nuestra metodología. Así, la activación ovocitaria, que fue superior al 83% en todos los casos, se sitúa en valores comparables a los obtenidos por Katayama *et al.* (2002) cuando cultivaron los ovocitos recién inyectados en un medio de FIV (TCM199) o por Lee *et al.* (2003), cuando emplearon el NCSU-23. Del mismo modo, nuestros resultados de formación pronuclear a las 22 h o de división a las 48h post-inyección, son similares a los obtenidos por otros autores (Lai *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 1998; Probst y Rath, 2003).

En resumen, los resultados de este primer experimento confirmaron nuestra hipótesis de que es beneficioso cultivar los ovocitos inyectados en medio de FIV antes de pasarlos a un medio de cultivo de embriones, aunque no se encontraron diferencias entre el empleo de 6 ó 20 horas. Pensamos que la mayor presencia del calcio necesario para la formación de los pronúcleos en el medio TALP puede ser una de las razones de estos resultados. Otros estudios también obtienen mejores porcentajes de blastocistos y número de células por blastocisto con piruvato y lactato durante los dos primeros días de cultivo embrionario en medio PZM y NCSU37 (Kikuchi *et al.*, 2002; Yoshioka *et al.*, 2002). De este modo, el mayor porcentaje de embriones de dos células obtenidos con el grupo TALP también puede deberse a la presencia en este medio (a pesar de no ser un medio exclusivo de cultivo embrionario) de piruvato y lactato.

Sin embargo, debido a que los porcentajes de blastocistos que obtuvimos no superaron los valores del 15% reportados por otros autores, decidimos continuar nuestro trabajo investigando en la línea de la segunda hipótesis planteada. Esta segunda hipótesis fue diseñada para introducir cambios en el sistema de maduración *in vitro*, y de esta manera intentar incrementar la maduración citoplasmática, por una parte mediante el uso de inhibidores meióticos, y por otra mediante cambios en la duración de MIV.

5.2 EFECTO DE LA ROSCOVITINA SOBRE LA MADURACIÓN *IN VITRO*, ICSI Y DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VIVO*.

Diversos autores que han empleado la técnica de ICSI en la especie porcina han sugerido que la inadecuada maduración citoplasmática del ovocito puede ser la causa del bajo desarrollo embrionario posterior (Kolbe y Holth, 1999; Probst y Rath, 2003). Para solventar estos problemas asociados a la maduración *in vitro* y más concretamente a la maduración citoplasmática, se han estado empleando diversos inhibidores que mantienen al ovocito en estadio de GV. De esta manera se intenta mimetizar las condiciones internas del folículo *in vivo* y se pretende incrementar el período de maduración citoplasmática. La roscovitina (Meijer *et al.*, 1997) es un potente inhibidor de factor promotor de la maduración (MPF) y se ha visto 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 cdc2. Además, es uno de los inhibidores que menos efectos perjudiciales han mostrado hasta el momento, y existen referencias de un posible efecto beneficioso del precultivo en presencia de este inhibidor (Coy *et al.*, 2003; Marchal *et al.*, 2001; Mermillod *et al.*, 2000). Sin embargo, los resultados deben interpretarse con precaución debido a que se ha demostrado que la roscovitina inhibe en parte la síntesis de ARN (Ljungman y Paulsen, 2001), no previene la mayoría de las modificaciones en los patrones de fosforilación de proteínas observados durante la maduración, (Vigneron *et al.*, 2004a) y algunas rutas implicadas en la regulación de la maduración de ovocitos bovinos parecen ser independientes de la actividad del MPF y de la reanudación de la meiosis (Vigneron *et al.*, 2004b).

Como primer paso de esta segunda experiencia, estudiamos el efecto inhibidor de la roscovitina sobre el estadio nuclear de los ovocitos a las 22 horas del cultivo y sobre los ovocitos después de la maduración *in vitro*. A continuación, estudiamos su efecto sobre la maduración citoplasmática, valorando el contenido intracelular de GSH y la formación del pronúcleo masculino tras la ICSI. Finalmente, los cigotos inyectados se transfirieron directamente al oviducto de cerdas receptoras con el fin de permitir su desarrollo en condiciones *in vivo*, dados los resultados obtenidos en la experiencia anterior con el cultivo *in vitro*.

En nuestro estudio, una concentración de 50 μ M durante 22h de cultivo fue suficiente para inhibir la rotura de la vesícula germinal en porcentajes superiores al 90%, siendo los resultados para GV-I y GV-III similares en los ovocitos recién recogidos y en aquellos cultivados con roscovitina. Por el contrario, al emplear el medio de MIV sin roscovitina, los ovocitos comenzaron espontáneamente a reanudar la meiosis. Además, cuando empleamos el medio NCSU37 sin dbAMPc, la progresión hasta estadios avanzados de GV-IV fue más rápida debido a la ausencia de efecto de este otro inhibidor (Funahashi *et al.*, 1997a). De esta manera, se demuestra que la progresión de los ovocitos porcinos hasta GV-III en presencia de 50 μ M de roscovitina se encuentra diferentemente inhibida que en presencia del dbAMPc o en ausencia de inhibidores, ya que los ovocitos cultivados con roscovitina permanecen en estadios nucleares similares a los de los ovocitos recién obtenidos por sección del folículo.

El efecto de la roscovitina como inhibidor de la reanudación de la meiosis ha sido previamente demostrado en cerdos. Ju *et al.* en 2003 encontraron que concentraciones de roscovitina de 80-120 μ M eran necesarias para inhibir la rotura de la vesícula germinal en el 83-91% de los casos. Sin embargo, en este trabajo se valoró el estadio nuclear de los ovocitos a las 44h del comienzo del cultivo en roscovitina, y posiblemente pensamos que la actividad del inhibidor podría haber disminuido en el medio debido al largo período de tiempo del cultivo. De hecho, la roscovitina tiene un período de vida en sangre de aproximadamente 24h (Meijer y Raymond, 2003). Igualmente, Mc. Clue *et al.* (2002) observaron que la roscovitina presenta un efecto máximo entre las 8 y 24 horas de cultivo.

El efecto reversible de la roscovitina en el núcleo se corrobora en nuestro estudio observando los elevados porcentajes de ovocitos en estadio de MII alcanzados después de 22h de cultivo en presencia de roscovitina y posterior cultivo de 44h en el sistema tradicional de MIV. Resultados similares fueron obtenidos por Mermillod *et al.* (2000) en vacas, que demostraron que utilizando roscovitina a concentraciones de 25 μ 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.

Aunque la reversibilidad del efecto de la ROS se ha demostrado en nuestro estudio mediante la obtención de gran porcentaje de ovocitos en MII, no podemos deducir con estos datos si realmente la maduración citoplasmática se ha incrementado o no. Está bien documentado que no existe siempre correlación directa entre la maduración nuclear y la citoplasmática (Coy *et al.*, 1999). La reanudación de la meiosis tras el cultivo en ausencia de roscovitina, presumiblemente reinicia la activación del MPF, pero no es un prerrequisito que nos asegure una correcta maduración citoplasmática. En cambio, el contenido de GSH intracelular y la capacidad del ovocito para descondensar la cabeza del espermatozoide y formar el pronúcleo masculino (PNM), son parámetros comúnmente aceptados para valorar la maduración citoplasmática en ovocitos porcinos (Coy *et al.*, 1999; Funahashi *et al.*, 1995; Sawai *et al.*, 1997).

El GSH depende de la cantidad de cisteína disponible para el ovocito (Meister y Tate, 1976). Esta cisteína se añade como sustrato para la síntesis de GSH de forma rutinaria en los medios de maduración de ovocitos porcinos (Yoshida *et al.*, 1993). Las concentraciones utilizadas comúnmente son de 0.57mM, y esta es la concentración utilizada en nuestro medio de maduración NCSU-37. En nuestro estudio, las concentraciones de GSH en los ovocitos recién recogidos del ovario fueron más bajas que en los ovocitos cultivados durante 22 o 44h en los medios de MIV, y los valores obtenidos en este último caso fueron similares a los obtenidos por Brad *et al.*, (2003). Esto nos indica que nuestro sistema de MIV fue efectivo en la síntesis de GSH por parte del ovocito.

A diferencia de lo obtenido por Yoshida *et al.*, (1993) el contenido en GSH de nuestros ovocitos fue superior a las 22h de cultivo que a las 44h. Estos autores observaron un incremento continuo de GSH durante el proceso de maduración. Pensamos que estas diferencias con respecto a nuestro sistema pueden ser debidas al medio de MIV utilizado; mientras que en nuestro estudio utilizamos el NCSU-37, Yoshida *et al.*, utilizan el medio TCM199, un medio rico en precursores de GSH (cisteína, cistina, ácido glutámico, glutamina y glicina) e incluso GSH. El NCSU-37 únicamente se suplementa con cisteína y glutamina, y se ha demostrado que la cisteína es auto-oxidada a cistina durante la primera hora de maduración (de Matos y Furnus, 2000), por lo que no puede incorporarse tan fácilmente como la cisteína (Yoshida y Takahashi, 1998).

Por otra parte, se ha estudiado que la síntesis de GSH durante fases tempranas y medias de la maduración de los ovocitos porcinos se lleva a cabo para que el ovocito adquiera la habilidad para descondensar el núcleo espermático (Yoshida, 1993) y la síntesis de GSH durante fases iniciales de maduración en hámster es responsable de los elevados niveles obtenidos en ovocitos maduros (Perreault *et al.*, 1988). De estas observaciones podemos deducir que existe una elevada síntesis de GSH durante las primeras etapas de la maduración y estaría en acuerdo con nuestros resultados donde observamos un pico de GSH después de las 22h del cultivo.

Los resultados obtenidos en esta experiencia parecen indicar un efecto del precultivo en presencia de roscovitina sobre el contenido en GSH. Los ovocitos precultivados en presencia del inhibidor durante 22h muestran niveles más elevados de GSH que los cultivados con dbAMPc durante el mismo período de tiempo. Esta sea posiblemente la primera referencia que relacione el contenido intracelular de GSH en los ovocitos con la utilización de un inhibidor como la roscovitina. Una explicación a estas diferencias podría encontrarse en la cooperación metabólica en el interior del complejo *cumulus*-ovocito. La captación de cisteína se ve interrumpida durante la pérdida de contacto entre el ovocito y las células del *cumulus*, es decir, durante la pérdida de las uniones tipo *gap* en el proceso de maduración (Yoshida y Takahashi, 1998), por lo que la síntesis de GSH cesa debido a esta falta de contacto celular (de Matos *et al.*, 1998). Durante la premaduración en roscovitina, no se observa expansión de las células del *cumulus*, a diferencia de los ovocitos tratados con dbAMPc (Marchal *et al.*, 2001; Coy *et al.*, 2004; Schoevers *et al.*, 2004). Este mayor tiempo de contacto entre las células del *cumulus* y el ovocito durante la premaduración en presencia de roscovitina podría explicarnos el mayor nivel de GSH obtenido en estos ovocitos.

En cuanto a los resultados evaluados tras la fecundación mediante ICSI, la formación pronuclear no se vio afectada por la premaduración en presencia de roscovitina al igual que el resto de parámetros valorados. Estos resultados eran de esperar debido a los niveles similares de GSH obtenidos en los distintos grupos tras la MIV. Además, está ampliamente estudiado que la formación del PNM está muy relacionada con el contenido intracelular de GSH (Yoshida *et al.*, 1992; Funahashi *et al.*, 1995). Los porcentajes de activación y de posibles embriones fueron semejantes a los obtenidos por otros autores sin el uso de la roscovitina (Kim *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003). No se ha encontrado ninguna referencia en cerdos del uso

de ovocitos premadurados en presencia de roscovitina y posteriormente fecundados por ICSI. Únicamente, recientemente en la especie equina se ha realizado un trabajo de ICSI con ovocitos premadurados en roscovitina (Franz *et al.*, 2003). Estos autores demuestran que la roscovitina es capaz de aumentar la capacidad de desarrollo cuando se utilizan ovocitos con *cumulus* compacto, obteniendo mayores porcentajes de división que sin el uso de la misma. En nuestro trabajo, también se demostró que la roscovitina afectaba a la velocidad de división de los cigotos, valorada a las 22 hpi, ya que el grupo de ovocitos madurados tras el precultivo en roscovitina presentó mayores porcentajes de embriones de dos células que el grupo control. Al igual que en la experiencia anterior, estos resultados también confirmaron parcialmente nuestra hipótesis de partida, ya que, como hemos mencionado, el momento en el que ocurre la primera división es un importante indicador de la capacidad de desarrollo ulterior del embrión (Lonergan *et al.*, 1999). Sin embargo, en la especie bovina, este efecto de la roscovitina no ha podido ser demostrado (Mermillod *et al.*, 2000).

Para corroborar la posible mayor viabilidad de los embriones obtenidos a partir de ovocitos precultivados con roscovitina antes de la maduración, decidimos ubicarlos en el medio más fisiológico posible, transfiriéndolos al oviducto de cerdas receptoras tras la microinyección. Los resultados derivados de esta experiencia *in vivo* muestran que los embriones resultantes de la fecundación por ICSI y premadurados en presencia de ROS son capaces de iniciar gestaciones cuando se transfieren a las hembras receptoras, pero no son capaces de llegar a término. Los mismos resultados se observaron para el grupo control. Si tenemos en cuenta los estudios realizados en porcino mediante MIV-ICSI y transferencia de embriones (Kolbe y Holtz, 2000; Lai *et al.*, 2001; Martin, 2000; Nakai *et al.*, 2003; Probst y Rath, 2003), el número de lechones obtenidos es muy bajo. Únicamente un grupo de investigación ha logrado 3 lechones mediante la utilización de ovocitos madurados *in vitro* (Nakai *et al.*, 2003), y parece que el porcentaje de éxito aumenta mediante el uso de ovocitos madurados *in vivo* (Probst y Rath, 2003) con 6 a 7 lechones por camada.

Por lo tanto, pese al posible efecto beneficioso de la roscovitina sobre las primeras etapas de desarrollo embrionario, los cigotos producidos por ICSI difícilmente se desarrollan a término incluso en las mejores condiciones de cultivo (en el interior del oviducto porcino).

Con el empleo de la FIV tradicional, se sabe que sólo de un 20 a 30% de los embriones transferidos sobreviven a pesar de las mejoras de las técnicas de producción de embriones porcinos (Abeydeera, 2002) y únicamente alrededor de 6 lechones se obtienen por hembra transferida (Abeydeera *et al.*, 1998). Con el fin de demostrar que la roscovitina no era nociva para el desarrollo embrionario y se podía obtener descendencia viva a partir de ovocitos precultivados con este inhibidor, realizamos un estudio paralelo en nuestro laboratorio, no incluido en esta Tesis, mediante FIV tradicional. En él obtuvimos 10 y 12 lechones, respectivamente, de dos cerdas que quedaron gestantes tras la transferencia de cigotos, tanto en el grupo control como en el grupo en el que se empleó la roscovitina, siendo el primer caso en el que se ha obtenido descendencia viva en la especie porcina a partir de ovocitos madurados *in vitro* en presencia de este inhibidor (Coy *et al.*, 2004, 2005).

A nivel práctico, de las observaciones anteriores podemos deducir que se pueden emplear ovocitos premadurados en roscovitina obteniendo resultados similares a los observados sin el empleo de este inhibidor. La viabilidad de cultivar ovocitos porcinos bajo condiciones de inhibición meiótica con el uso de roscovitina, sin disminuir la capacidad de desarrollo, permite flexibilidad para ajustar el protocolo de trabajo en experimentos complejos. De esta manera, sería de gran utilidad en aquellos laboratorios donde no se disponga de un matadero cercano para la recogida de los ovarios, o en aquellos casos donde nos interese estudiar a nivel molecular los acontecimientos que ocurren durante el estadio de la GV, período como hemos comentado en el apartado de la revisión bibliográfica, de gran importancia en el desarrollo ovocitario.

Utilizando esta estrategia (mantener a los ovocitos recogidos de matadero en presencia de roscovitina durante unas horas, para ajustar nuestro protocolo de trabajo), decidimos estudiar el efecto de las horas de maduración *in vitro* sobre el rendimiento de la ICSI. Se sabe que la edad de los ovocitos es un factor crítico, y ovocitos demasiado viejos presentan su capacidad de desarrollo limitada. Además, se sabe que en estos ovocitos viejos existe poca cantidad de MPF implicado en la fosforilación de una proteína p220 que se une a la tubulina y afecta a la formación de los microtúbulos. De esta manera, los ovocitos viejos presentan mayor grado de fragmentación que el resto de ovocitos (Kikuchi, 2000). Creímos oportuno el realizar esta experiencia ya que no existen referencias en la

especie porcina que comparen el efecto del tiempo de MIV en los resultados de fecundación por ICSI.

Utilizamos tres tiempos de maduración que se han estado empleando en la MIV porcina; 36h (Yoshida *et al.*, 1993; Ka *et al.*, 1997), 40h (Galeati *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1997) y 44h (Galeati *et al.*, 1991; Coy *et al.*, 2003). El precultivo en roscovitina, como hemos indicado, nos permitió ajustar el horario de inyección. Ya habíamos demostrado en la experiencia anterior que los ovocitos premadurados en roscovitina y sometidos a 44h de MIV alcanzaban el estadio de 2 células tras la fecundación antes que los ovocitos control. En esta ocasión, pretendíamos averiguar, tras el precultivo en roscovitina, si el tiempo de MIV podría acortarse para mejorar el desarrollo embrionario post-ICSI.

Los resultados confirmaron esta hipótesis, ya que al reducir el tiempo de maduración, el porcentaje de cigotos con dos pronúcleos que obtuvimos aumentó significativamente. En los ovocitos madurados durante 40 ó 44 horas, el desarrollo fue más lento, y la formación del pronúcleo masculino tras la ICSI se vio retrasada con respecto a los ovocitos madurados 36h. En la bibliografía consultada, este estudio no ha sido realizado, y los tiempos de MIV para la ICSI han variado de 42 a 50h (Kim *et al.*, 1998; Lai *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003). No obstante, los porcentajes de cigotos viables en todos los estudios no han alcanzado los niveles que presentamos en este trabajo (73.5%). Pensamos que gran parte de estas diferencias son debidas al uso de diferentes tratamientos exógenos para activar a los ovocitos, así como la calidad de los ovocitos empleados y al sistema de MIV. El material que utilizamos de partida en nuestro estudio proviene de hembras híbridas comerciales de 85-95kg de peso (8-9 meses de edad) muy próximas a la pubertad. Además, el matadero se encuentra a una hora de nuestro laboratorio de manera que los ovarios llegan en buenas condiciones. La sección de los folículos se realiza mediante bisturí. Se sabe que el método de recogida de los ovocitos afecta al desarrollo posterior. Liu y Moor en 1997 obtuvieron mayores porcentajes de maduración nuclear y divisiones en ovocitos procedentes de folículos diseccionados con bisturí frente a los ovocitos obtenidos mediante aspiración del folículo. En nuestro estudio, únicamente se seccionan con el bisturí los mejores folículos de manera que en este nivel ya estamos seleccionando gran parte de los ovocitos. Una segunda selección más exhaustiva se realiza bajo el estereomicroscopio, donde únicamente se recogen los ovocitos con citoplasma granular y

homogéneo rodeados por varias capas de células de *cumulus*. Este factor también es de gran importancia en los sistemas de producción de embriones porcinos (Coy y Romar, 2002).

Otro factor crucial, como hemos comprobado, puede ser la edad de los ovocitos empleados. Los ovocitos más viejos tienen menor capacidad de ser fecundados que los ovocitos 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). Funahashi *et al.* en 1997 demostraron que alrededor del 47% de los ovocitos alcanzaban la MII a las 36 horas de MIV por lo que la gran mayoría de los ovocitos eran viejos a la hora de la fecundación *in vitro*.

Por otra parte, existen referencias en la especie bovina (Marchal *et al.*, 2001; Mermillod *et al.*, 2000) que demuestran que después del cultivo en roscovitina, el tiempo necesario para alcanzar la MII se acorta, aunque este hecho no se ha demostrado en la especie porcina. Para verificar que las diferencias observadas en nuestro estudio no tenían relación con el precultivo con roscovitina, diseñamos un experimento adicional en el que los ovocitos fueron madurados durante 36h con o sin premaduración en presencia del inhibidor.

Como muestran los resultados, no se observaron diferencias significativas para ninguna de las variables analizadas y de nuevo el porcentaje de posibles cigotos viables alcanzó el 70%. Esto nos indica, que si bien cuando el período de MIV es de 44h se afecta el desarrollo embrionario temprano por el uso previo o no de un inhibidor como la roscovitina, en el caso de períodos de maduración más cortos, como 36h, esto no ocurre, situándose los valores de cigotos con 2PN, en niveles muy elevados, superiores a los obtenidos por la mayoría de los grupos tras la ICSI porcina.

Tras analizar estos resultados, nos quedaba por investigar la posibilidad de que los fallos en el desarrollo embrionario post-ICSI estuvieran relacionados con una inadecuada activación durante el proceso de microinyección, como han sugerido otros equipos de investigación (Lai *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003; Nakai *et al.*, 2003; Probst *et al.*, 2003).

5.3 EFECTO DEL InsP_3 SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO*.

Con los resultados de ICSI obtenidos a lo largo de las experiencias anteriores, podemos afirmar que no es necesaria la activación del ovocito tras la inyección del espermatozoide, ya que los valores obtenidos son similares o incluso superiores a otros autores que utilizan pulsos eléctricos, tratamiento de los ovocitos con ionóforo de calcio, inyección de calcio o etanol. Simplemente con el estímulo del espermatozoide es suficiente para activar al ovocito y que se inicie el desarrollo embrionario. Sin embargo, al ser tan bajo el número de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto (aunque no inferior al resto de autores), nos planteamos la posibilidad de que la activación producida no fuese la adecuada y que por ello, el ovocito fuera incapaz de desencadenar todas las etapas posteriores que conducen finalmente a la formación del blastocisto.

Entre los mensajeros que participan en la activación ovocitaria se encuentra el inositol 1, 4, 5-trifosfato (InsP_3 ; Wu *et al.*, 2001). El mecanismo de acción de esta molécula consiste en inducir un incremento en la concentración de calcio intracelular al liberarse este ion de su reservorio: el retículo endoplásmico. Aunque el mecanismo por el cual la fusión espermatozoide-ovocito provoca las diferentes oscilaciones de calcio en el ovocito no está dilucidado, sí se ha puesto en evidencia la activación de la vía del fosfoinositol, que conduce a la activación de una isoforma de la fosfolipasa C, la cual media en la hidrólisis del PIP_2 produciendo DAG e InsP_3 , y éste finalmente induce la liberación de calcio del retículo endoplásmico. Miyazaky *et al.* en 1993, demostraron la funcionalidad del InsP_3 durante el proceso de fecundación. Estos autores inyectaron anticuerpos inhibidores de los receptores de InsP_3 y observaron un bloqueo en la liberación del calcio.

En principio pensamos que la liberación de calcio provocada como consecuencia de la inyección del espermatozoide no era similar, en el ritmo y en la intensidad, a la que se produce como consecuencia de la fusión del espermatozoide a las envolturas del ovocito, ya que aunque hubiera activación, el desarrollo embrionario posterior era deficiente, aunque similar al de otros autores. Por ello, decidimos continuar con nuestra tercera hipótesis, intentando mejorar la activación ovocitaria mediante la inyección del espermatozoide junto con InsP_3 , molécula intracelular que

fisiológicamente media en el proceso necesario para la liberación de calcio. *In vitro*, Amano *et al.* (2004) utilizaron esta molécula como activador partenogenético en la especie porcina. Demostraron que la inyección de InsP_3 en el ovocito promueve la activación, la división e incluso el desarrollo embrionario hasta blastocisto y que esta capacidad podría estar relacionada positivamente con el incremento de Ca^{+2} inducido por el InsP_3 .

Los resultados que obtuvimos, valorados como proporción de blastocistos, no mostraron, en contra de lo esperado, ninguna mejoría tras la inyección del InsP_3 junto con los espermatozoides con respecto a los observados para el grupo control (espermatozoides inyectados sin InsP_3). Hasta el momento no hemos encontrado en la bibliografía investigadores que utilicen el InsP_3 junto con el espermatozoide para intentar optimizar el rendimiento de la ICSI en la especie porcina. Sin embargo, en el ratón, Kurokawa y Fissore (2003) han demostrado que la fecundación mediante ICSI modifica el inicio de las oscilaciones de calcio y provoca una menor persistencia y duración de estas oscilaciones que la FIV tradicional, relacionando este hecho con la menor capacidad de desarrollo embrionario de los cigotos producidos por ICSI. Los resultados obtenidos podrían ser explicados, como han propuesto Banrezes *et al.* (2004), porque no hemos imitado adecuadamente la dinámica del calcio en el ovocito tras la fecundación, que consiste en una serie de funciones de activación e inhibición secuenciales. Estos autores consiguieron descendencia viva en ratones (67%) después de someter a los ovocitos fecundados a 24 pulsos eléctricos cada 8 minutos durante tres horas, que se correspondieron con 24 oscilaciones de calcio causadas por la liberación de calcio intracelular. Quizá en nuestro caso, si se hubiera introducido el InsP_3 en el ovocito o en el medio de cultivo secuencialmente, habríamos observado alguna mejora. No obstante no podemos interpretar categóricamente estos resultados, debido al escaso número de blastocistos obtenidos en esta experiencia. Lai *et al.* en 2001 obtienen unos porcentajes de blastocistos del 30%, pero en este caso se emplearon ovocitos activados artificialmente mediante pulsos eléctricos, y cuando se eliminó esta activación, lo cual podría ser comparable a nuestro grupo control, el porcentaje de blastocistos disminuyó hasta el 4.6%, algo similar a lo obtenido en nuestra experiencia.

El porcentaje de división también presentó rangos similares cuando los espermatozoides se inyectaron en el ovocito, independientemente de la presencia o ausencia de InsP_3 . Sin embargo, cuando inyectamos la solución

tampón en el ovocito o el InsP_3 sin espermatozoides, sí encontramos diferencias, lo que demuestra la activación del ovocito como consecuencia del InsP_3 . En todos los caso estos porcentajes son inferiores a los que obtienen Amano *et al.* (2004) cuando utilizan altas concentraciones de InsP_3 (78.1%). La diferencia podría estribar en la concentración de InsP_3 ya que nosotros siempre trabajamos con una concentración menor de $500\mu\text{M}$. En cualquier caso, en nuestro experimento, el efecto del espermatozoide sobre la división fue superior al provocado por el InsP_3 . Por tanto estos resultados indican que el estímulo del espermatozoide en la especie porcina es suficiente para obtener niveles de división comparables con aquellos grupos que utilizan agentes activantes. No obstante, en algún paso entre la inyección del espermatozoide y la puesta en marcha de los mecanismos correctos que llevarán al cigoto a formar un blastocisto, hay un vacío que hasta el momento ninguna investigación ha sido capaz de llenar.

INVESTIGACIÓN FUTURA

6

INVESTIGACIÓN FUTURA

NOVEDADES METODOLÓGICAS

- Es el primer estudio en el que se compara una secuencia de empleo de dos medios de cultivo post-ICSI para identificar su efecto en el rendimiento final de la técnica.
- Otra novedad es la utilización de un sistema de maduración *in vitro* en dos pasos, el primero en presencia de un inhibidor meiótico, en el que se mide el contenido intracelular de glutatión y se comparan parámetros de fecundación por ICSI en ovocitos porcinos premadurados.
- Es el primer estudio en la especie porcina en el que se inyecta InsP₃ conjuntamente con el espermatozoide.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS

Las líneas de investigación deberían encaminarse a la mejora en los medios de cultivo embrionario ya sea mediante cocultivos celulares (células oviductales y endometriales) o mediante variaciones en su composición. Un aspecto importante que podría estudiarse es el efecto de las oviductinas en el ovocito y posterior desarrollo embrionario.

Sería también de interés evaluar el efecto de diferentes concentraciones de InsP₃ en diferentes tiempos y analizar las oscilaciones de calcio mediante mediciones del calcio intracelular. Se podrían comparar estos patrones con los patrones de FIV e intentar explicar el escaso desarrollo de los ovocitos inyectados.

Por último, se podría estudiar el sistema de microtúbulos y microfilamentos tras la ICSI para ver si se altera. Si fuera así, explicaría en parte el bajo desarrollo embrionario que se obtiene actualmente con esta técnica.

CONCLUSIONES

7

CONCLUSIONES

1. Los cigotos porcinos producidos por ICSI alcanzan el estadio de dos células a las 22h en mayor proporción si se cultivan 6 ó 20 horas previamente en medio TALP que si se cultivan directamente en medio NCSU-23.
2. El cultivo de los ovocitos porcinos en presencia de 50µM de roscovitina durante 22h inhibe la meiosis y aumenta el contenido intracelular de glutatión. Este efecto es reversible tras la maduración *in vitro* y produce un aumento en los porcentajes de cigotos que alcanzan el estadio de 2 células tras la ICSI.
3. Los cigotos obtenidos por ICSI son capaces de iniciar gestaciones cuando se transfieren a una hembra receptora, independientemente de si han sido tratados o no con roscovitina.
4. Un período de maduración *in vitro* de 36h incrementa los porcentajes de cigotos en estadio de 2 pronúcleos a las 22h tras la ICSI, independientemente de la premaduración en roscovitina.
5. La inyección conjunta del espermatozoide con inositol trifosfato no incrementa el rendimiento final de la ICSI en la especie porcina.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

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

CE: cultivo *in vitro* de embriones

COCs: complejos células del *cumulus oophorus*-ovocito

DAG: diacilglicerol

dbAMPc: dibutilil AMP cíclico

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

FIV: fecundación *in vitro*

FSH: hormona folículo estimulante

GC: gránulos corticales

GV: vesícula germinal

GVBD: ruptura de la vesícula germinal (*Germinal Vesicle Breakdown*)

hpi: horas post inyección

HCG: gonadotropina coriónica humana (*Human Chorionic Godanotropin*)

ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides (*Intracytoplasmic Sperm Injection*)

InsP₃: inositol 1,4,5 trifosfato

InsP₃-R: receptores del inositol 1,4,5-trifosfato

MI: metafase I

MII: metafase II

MIV: maduración *in vitro*

MPF: factor promotor de la maduración (*Maturation Promoting Factor*)

N céls/blastocisto: número medio de células por blastocisto

NCSU: medio *North Carolina State University*

PBS: tampón fosfato salino de Dulbecco modificado (*Phosphate Buffer Saline*)

PFF: fluido folicular porcino (*Porcine Follicular Fluid*)

PIP₂: fosfoinositol bifosfato

PKC: proteínquinasa C

PMSG: gonadotropina sérica de yegua gestante (*Pregnant Mare Serum Gonadotropin*)

PNM: pronúcleo masculino

PVP: polivinilpirrolidona

TALP: medio de Tyrodes con albúmina, lactato y piruvato (*Tyrodes Albumin Lactate Pyruvate*)

TCM199: medio de cultivo 199 (*Tissue Culture Medium-199*)

ZP: zona pelúcida