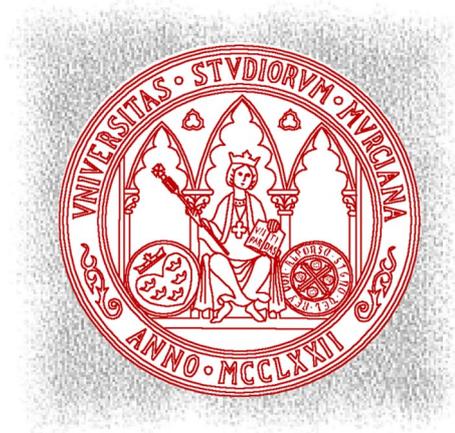


UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Biología Animal
Cátedra de Fisiología Animal



**“EFECTO DE LAS CÉLULAS OVIDUCTALES Y DEL
CUMULUS OOPHORUS SOBRE DIFERENTES
PARÁMETROS BIOLÓGICOS RELACIONADOS CON LA
FECUNDACIÓN *IN VITRO* EN LA ESPECIE PORCINA”**

RAQUEL ROMAR ANDRÉS
MURCIA, NOVIEMBRE DE 2.001



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Biología Animal
Cátedra de Fisiología Animal

PILAR COY FUSTER y **SALVADOR RUIZ LÓPEZ**, Profesores Titulares del Departamento de Biología Animal (Fisiología Animal), de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia,

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título “EFECTO DE LAS CÉLULAS OVIDUCTALES Y DEL *CUMULUS OOPHORUS* SOBRE DIFERENTES PARÁMETROS BIOLÓGICOS RELACIONADOS CON LA FECUNDACIÓN *IN VITRO* EN LA ESPECIE PORCINA” de la que es autora la Lcda. en Veterinaria **Dña. Raquel Romar Andrés**, ha sido realizada bajo nuestra dirección y cumple todas las condiciones necesarias para su lectura.

Murcia a 1 de Octubre de 2001

Fdo.: Pilar Coy Fuster

Fdo.: Salvador Ruiz López

Este trabajo ha sido financiado por el Instituto de Fomento (INFO) de la Región de Murcia, por la Consejería de Trabajo y Política Social y cofinanciado por el Fondo Social Europeo a través del Programa Operativo Integrado para la Región de Murcia 2000-2006 mediante una beca del Programa Séneca.

Financiado parcialmente por los proyectos FEDER (1FD97-501), Acciones Integradas Hispano alemanas (HA99-115 y DAAD 314) y CICYT (AGL 2000-0485-C02-01).

A Mamá, Papá, Alfon, Vivi y Tara.

Aunque no es nada fácil resumir mi agradecimiento, sí me gustaría comenzar este trabajo intentando expresar mi reconocimiento:

A mis directores, Pilar Coy y Salvador Ruiz, por su paciencia conmigo, su apoyo, su confianza, su ilusión, su valía y su inestimable ayuda, no sólo en este trabajo sino durante los años en los que he tenido el placer de trabajar a su lado.

A Joaquín Gadea por su buen humor, su forma de ver las cosas y, como no, por su asesoramiento estadístico.

A Carmen Matás por su constancia y sus acertadas sugerencias sobre este trabajo.

A Elena Sellés por su compañerismo y su trabajo constante.

Al Dr. Detlef Rath del Departamento de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Comportamiento Animal (Mariensee, Alemania) por su cálida acogida, por poner a nuestra disposición su equipo humano y técnico y por hacerme sentir en su país como en mi propia casa. Vielen dank.

A Dña. Antje Frenzel y Dña. Birgit Sieg del Departamento de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Comportamiento Animal (Mariensee, Alemania) por su profesionalidad, su entusiasmo en el laboratorio y su valiosa ayuda con los embriones.

Al Dr. Wilfrid Kues del Instituto de Ciencia y Comportamiento Animal (Mariensee, Alemania) por su experimentado apoyo en las pruebas de inmunocitoquímica y por proporcionarme todo el material necesario para su ejecución.

A l@s compañer@s de Fisiología Animal que durante estos años han estado ahí, especialmente a Marco A. Marco por su dedicación en el laboratorio y por tener siempre un momento para los experimentos.

A D. Salvador Sánchez Espín y a FADESPORM por aceptar la participación como empresa en la beca predoctoral que nos fue concedida por el INFO y la Consejería de Política Social y Trabajo a través del programa Séneca, entidades a las que agradezco este apoyo a mi formación.

A mis amig@s, muy especialmente con todo mi cariño y agradecimiento a Noe, Javi, Emedé, Drex, Pilar y Rafa por estar ahí cuando la situación no fue favorable; a Carlos de Jódar por el apoyo técnico y a Alber por las casualidades y las sincronías.

A mi familia y a tod@s los que de alguna manera han contribuido y ayudado a la elaboración de este trabajo.

A Óskar por muchísimas cosas y al K.L por los buenos ratos y las risas.

A los Drs. Carlo Tamanini del Departamento de Producción Animal y Biotecnología Veterinaria (Facultad de Veterinaria, Universidad de Parma, Italia) y Heriberto Rodríguez-Martínez del Departamento de Obstetricia y Ginecología (Facultad de Veterinaria, Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas, Uppsala, Suecia) por aceptar gustosamente la revisión de este trabajo, a pesar de sus apretadas agendas, y por la elaboración de los informes favorables oportunos pudiendo optar así a la mención de Doctor Europeo.

Al Dr. Hans Merkt del Departamento de Medicina Reproductiva (Facultad de Veterinaria, Hanover, Alemania) que aceptó muy amablemente la revisión de este manuscrito y, desgraciadamente, falleció antes de poder realizarla.

ÍNDICE

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	2
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
2.1 SITUACIÓN ACTUAL Y PROBLEMÁTICA DE LA FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i> (FIV) PORCINA	7
2.2 POSIBLES VÍAS DE ABORDAR EL PROBLEMA	9
2.2.1 Estudios a nivel bioquímico y/o molecular	9
2.2.1.1 Fluido oviductal	9
2.2.1.2 Medios de cultivo para fecundación <i>in vitro</i>	13
2.2.2 Estudios a nivel celular	18
2.2.2.1 Ovocito	18
2.2.2.2 Espermatozoide	25
2.2.2.3 Células del <i>cumulus oophorus</i>	30
2.2.2.4 Células oviductales	34
2.3 OTROS ESTUDIOS: INTERACCIONES CÉLULAS-MOLÉCULAS	39
2.3.1 Interacciones <i>in vivo</i>	39
2.3.2 Interacciones <i>in vitro</i>	40
3. MATERIAL Y MÉTODOS	43
3.1 MEDIOS DE CULTIVO Y SUPLEMENTOS	43
3.2 CULTIVO DE CÉLULAS EPITELIALES DE OVIDUCTO PORCINO (POEC)	46
3.3 PRUEBAS DE INMUNOCITOQUÍMICA	47
3.3.1 Valoración microscópica de resultados	48
3.4 OBTENCIÓN DE OVOCITOS Y MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> (MIV).....	48

3.5 OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES Y FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i>	49
3.5.1 Valoración microscópica de resultados	50
3.6 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIONES (CE).....	51
3.6.1 Valoración microscópica de resultados	53
3.7 DIGESTIÓN DE LA ZONA PELÚCIDA (ZP)	55
3.8 ESTUDIO DE GRÁNULOS CORTICALES (GC)	55
3.8.1 Valoración microscópica de resultados	57
3.9 DISEÑO EXPERIMENTAL	59
3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	63
4. RESULTADOS	66
4.1 ANÁLISIS DE LA PUREZA DEL CULTIVO DE CÉLULAS OVIDUCTALES	66
4.2 EFECTO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DEL OVIDUCTO Y DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULUS SOBRE LOS RESULTADOS DE LA FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i> Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO	68
4.2.1 Efecto, sobre la FIV y el CE, de la preincubación en células oviductales antes de la FIV de ovocitos con cúmulus y denudados	68
4.2.2 Efecto, sobre la FIV y el CE, de la presencia de células oviductales durante la FIV de ovocitos con cúmulus y denudados	70
4.3 EFECTO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DEL OVIDUCTO Y DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULUS SOBRE LA RESISTENCIA DE LA ZONA PELÚCIDA (ZP)	73
4.3.1 Efecto de la preincubación en células oviductales de ovocitos con cúmulus y denudados sobre la resistencia de la ZP	73

4.3.2 Efecto de la presencia de células oviductales durante la FIV de ovocitos con cúmulus y denudados sobre la resistencia de la ZP	74
4.4 EFECTO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DEL OVIDUCTO Y DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULUS SOBRE LA DENSIDAD Y DISTRIBUCIÓN DE LOS GRÁNULOS CORTICALES	75
4.4.1 Efecto, sobre la densidad y distribución de los GC, de la preincubación en células oviductales de ovocitos con cúmulus y denudados	75
4.4.2 Efecto, sobre la densidad y distribución de los GC, de la presencia de células oviductales durante la FIV de ovocitos con cúmulus y denudados	78
5. DISCUSIÓN	81
6. CONCLUSIONES	94
7. RESUMEN	96
8. SUMMARY	99
9. ABREVIATURAS	102
10. BIBLIOGRAFÍA	104

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Los avances experimentados en el campo de la Biotecnología de la Reproducción, especialmente en las dos últimas décadas, han sido considerables. Entre ellos, la posibilidad de obtener animales modificados genéticamente abre numerosas expectativas a la comunidad biomédica. El empleo del cerdo, en sustitución de los roedores, como animal “modelo” por su mayor tamaño (Wall et al., 1997) y sus características fisiológicas más cercanas a la especie humana está incrementando la demanda de embriones porcinos para acometer distintos programas de tecnología transgénica. Sin embargo, a pesar de este alentador futuro en campos como los xenotransplantes o la transgénesis, la obtención *in vitro* de embriones porcinos viables cuenta hoy en día con algunas limitaciones y un rendimiento final de la técnica que podríamos calificar de medio-bajo (entre el 30-40% de blastocistos).

La producción *in vitro* efectiva de embriones porcinos normales nos permitiría obtener no sólo material para aplicaciones genéticas, sino también descubrir información sobre los mecanismos básicos de la fecundación y el desarrollo embrionario. En la especie porcina, la polispermia es uno de los mayores problemas asociados a la fecundación *in vitro* (FIV; Funahashi y Day, 1997) ya que supone una condición letal en los embriones de mamíferos (Hunter, 1976). Lamentablemente, aunque los intentos que se han ejecutado para superar esta contrariedad han sido, y continúan siendo, numerosos (Coy et al., 1993a; Niwa, 1993; Nagai, 1994; Funahashi y Day, 1997; Funahashi y Nagai, 2001), todavía no se dispone de un sistema de FIV porcina que pueda producir repetidamente bajos *ratios* de polispermia (Suzuki et al., 2000).

Entre las causas *in vitro* de la polispermia se ha atribuido un “fallo” en la llamada “reacción de zona”. Por este mecanismo, cuando el espermatozoide contacta con la zona pelúcida del ovocito (ZP), el contenido de los gránulos corticales (GC) es liberado al espacio perivitelino modificando los receptores de la ZP y bloqueando la entrada adicional de espermatozoides. Este “fallo” se ha atribuido a distintas causas, entre ellas un retraso en la propia reacción de zona (Sathananthan y Trounson, 1892), una falta de dispersión del contenido cortical en el espacio perivitelino (Cran y Cheng, 1986) o una incorrecta maduración citoplasmática del ovocito (Galeati et al., 1991; Niwa 1993).

Parece obvio que se impone la necesidad de realizar estudios sobre aquellos factores que pudieran mejorar estos resultados profundizando en el efecto que tienen sobre los gametos así como sobre el posterior desarrollo embrionario temprano. Además, no debería perderse de vista la idoneidad de realizar todos estos futuros estudios con semen congelado-descongelado debido a la posibilidad que ofrece su empleo a la hora de estandarizar condiciones entre los distintos laboratorios (Nagai et al., 1988; Wang et al., 1991) y su posterior comparación de resultados. Además se ha sugerido que el semen crioconservado aporta mejores resultados de monospermia (Zheng et al., 1992) e incluso los espermatozoides de epidídimo congelados-descongelados podrían ofrecer ventajas frente al semen eyaculado tal y como ya han sugerido algunos autores (Rath y Niemann, 1997).

Las revisiones sobre FIV en la especie porcina en los últimos años apuntan a la necesidad de realizar nuevos estudios sobre las características del proceso de fecundación en sí para resolver el problema persistente de la polispermia así como para mejorar los resultados del cultivo de embriones. Algunos equipos ya han propuesto la necesidad de profundizar en el “desfase” existente entre las condiciones de laboratorio con respecto a las fisiológicas (Leese, 1988; Coy et al., 1993a; Martus et al., 1998) como vía para mejorar los resultados. Este desajuste entre las condiciones *in vivo* vs. *in vitro* sugiere la conveniencia de realizar nuevos estudios a dos niveles: por un lado en el ámbito de medios de cultivo, bien estudiando la posibilidad de formular nuevos medios para FIV o bien adecuando los ya existentes y, por otro, emprendiendo el estudio del microambiente celular que existe en los momentos cercanos a la fecundación con la participación tanto del epitelio oviductal como de las células foliculares que rodean al ovocito.

Centrándonos en el segundo aspecto, hace más de una década que se introdujo en los sistemas de cultivo la presencia de células oviductales como herramienta para tratar de aproximar o imitar las condiciones del laboratorio a las que los gametos encuentran en el oviducto (Nagai y Moor, 1990). De este modo, los cultivos *in vitro* de células oviductales se han empleado, en distintos momentos de la FIV (Nagai y Moor, 1990; Kano et al., 1994; Dubuc y Sirard, 1995), con las células bajo distintas condiciones (Nagai y Moor, 1990; Kano et al., 1994; Dubuc y Sirard, 1996), procedentes de distintas partes del oviducto (Suarez et al., 1991; Dubuc y Sirard, 1996; Fazeli et al., 1999) o de distintos estadios del ciclo reproductivo (Techakumphu y Srianan, 1994; Vatzias y Hagen, 1999). En general las células oviductales incrementan la penetrabilidad y parecen tener, según algunos autores, un efecto favorecedor de la monospermia (Nagai y Moor, 1990; Dubuc y Sirard, 1996). Sin embargo, hasta la fecha, el posible efecto de estas células durante el proceso de fecundación sobre el

posterior desarrollo embrionario temprano, el endurecimiento de la zona pelúcida o el posible efecto sobre la exocitosis de los gránulos corticales no está documentado. Además, parecen existir diferencias de comportamiento según el tipo de espermatozoides empleados (eyaculados frescos vs. eyaculados congelados) que podrían modificar los resultados de penetrabilidad (Romar et al., 2001) careciéndose de referencias si se emplean espermatozoides de epidídimo.

Con respecto a las células del *cumulus oophorus* aunque todos los autores parecen coincidir en que son necesarias a lo largo del proceso de maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos para una adecuada maduración citoplasmática y favorecer la posterior formación del pronúcleo masculino (Funahashi y Day, 1997) no parece ocurrir lo mismo con los estudios en FIV. Aunque en condiciones *in vivo* los ovocitos porcinos entran en el oviducto y son fecundados rodeados por sus células del cúmulus, actualmente existe una controversia sobre la adecuación del empleo para FIV de ovocitos desnudos o rodeados por una parte de sus células del *cumulus oophorus* debido a los resultados contradictorios alcanzados por los distintos autores (Kikuchi et al., 1993; Wang et al., 1994; Ka et al., 1997; Campos et al., 2001). Además, estos trabajos han sido llevados a cabo deteniendo el proceso tras la fecundación, por lo que carecemos de datos sobre la ulterior calidad de los embriones procedentes de ovocitos fecundados en presencia o ausencia de células del cúmulus. Igualmente, los estudios del papel del cúmulus sobre una posible modificación de las características de la zona pelúcida en la especie porcina no son tan numerosos como en otras especies (por ejemplo, roedores) y aunque sí existen interesantes estudios sobre el efecto del cúmulus sobre los gránulos corticales durante el periodo de MIV (Galeati et al., 1991), lamentablemente no ocurre lo mismo en los momentos cercanos a la fecundación.

Resumiendo, aunque no podemos decir que el efecto de ambos tipos celulares no haya sido analizado en mayor o menor grado, sí es cierto que su posible papel sobre parámetros biológicos como el desarrollo embrionario temprano, la resistencia de la ZP o la densidad y distribución de los GC (ambos implicados en la reacción de zona y la prevención efectiva de la polispermia), se han mantenido práctica o totalmente al margen. Por todo ello, los objetivos de este trabajo experimental han sido los siguientes:

- 1) Caracterizar la pureza del cultivo celular procedente de la obtención de células oviductales de animales prepúberes mediante un método enzimático.

2) Estudiar el efecto de las células oviductales y del *cumulus oophorus* **antes** y **durante** la fecundación *in vitro* sobre los resultados de la misma y el posterior desarrollo embrionario *in vitro* empleando espermatozoides epididimarios congelados-descongelados.

3) Analizar el efecto de la presencia de las células oviductales y del *cumulus oophorus* **antes** y **durante** la fecundación *in vitro* sobre la posterior resistencia de la zona pelúcida de los ovocitos a la digestión enzimática, con el mismo tipo de espermatozoides.

4) Estudiar el papel de las células oviductales y del cúmulus sobre la distribución y densidad de los gránulos corticales **antes** y **durante** de la fecundación *in vitro* con espermatozoides epididimarios crioconservados.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 SITUACIÓN ACTUAL Y PROBLEMÁTICA DE LA FECUNDACIÓN *IN VITRO* (FIV) PORCINA

En la especie porcina la primera obtención de descendencia viva mediante fecundación *in vitro* (FIV) se llevó a cabo hace 16 años (Cheng, 1985) y desde entonces distintos laboratorios han registrado el nacimiento de lechones bajo distintas condiciones experimentales (Mattioli et al., 1989; Yoshida et al., 1993a). Sin embargo, todavía existen una serie de problemas asociados a esta especie que impiden que el rendimiento de los sistemas actuales de FIV sea plenamente satisfactorio.

Los dos problemas clásicos que han acompañado a la FIV en la especie porcina han sido los bajos porcentajes de formación de pronúcleo masculino (PNM) tras la fecundación y la polispermia, que en esta especie sigue siendo elevada.

Actualmente, podemos decir que el primero de los obstáculos se considera resuelto (Funahashi y Day, 1997) gracias a las sucesivas modificaciones y mejoras de los medios empleados para la maduración *in vitro* (MIV) tales como la eliminación del suero fetal bovino (Naito et al., 1988; Funahashi y Day, 1993a), la suplementación con fluido folicular porcino (Naito et al., 1988) y cisteína (Yoshida et al., 1992), así como el ajuste de los suplementos hormonales durante la MIV (Funahashi y Day, 1993b).

Por lo que respecta a la polispermia, ésta ha sido resuelta sólo parcialmente gracias a la reducción del número de espermatozoides capacitados puestos en contacto con los ovocitos, pero continúa siendo el principal obstáculo para la obtención de cigotos viables, y posteriormente embriones, y permanece como la principal causa del bajo rendimiento de los sistemas de FIV porcina. Obviamente, los estudios que en los últimos años han ahondado en la búsqueda de la(s) posible(s) causa(s) de este problema han sido numerosos y a continuación intentaremos resumirlos brevemente.

Entre los motivos clásicos de la polispermia se han citado la inadecuada MIV de los ovocitos, que les llevaría a sufrir una incorrecta reacción cortical posibilitando la entrada de espermatozoides adicionales en el citoplasma (Galeati et al., 1991; Niwa, 1993), el excesivo número de espermatozoides que alcanzan los ovocitos durante la FIV (Hunter y Nichol, 1988) o, tal y como ya vienen sugiriendo algunos autores, las diferencias existentes entre las condiciones *in vitro* vs. *in vivo* (Leese, 1988; Coy et al., 1993a). Con respecto a la primera de las razones, un reciente estudio mostró que los

ovocitos porcinos madurados *in vitro* y posteriormente transferidos a cerdas receptoras son capaces de ser fecundados correctamente dando lugar a descendencia viva (Coy et al., 1999). Además, el problema de la polispermia también se ha referido por aquellos autores que han trabajado con ovocitos madurados *in vivo* (Coy et al., 1993a) sin que, por lo tanto, la MIV parezca ser la causa principal de la misma.

La segunda causa, el excesivo número de espermatozoides durante la FIV, parece lógica ya que en condiciones *in vivo* también se ha observado polispermia cuando se deposita en el interior de los oviductos un número elevado de espermatozoides (Hunter y Nichol, 1988). Además son numerosos los estudios que han demostrado la relación directamente proporcional entre la polispermia y la elevada concentración espermática experimental. Por este motivo, el ajuste de dicha concentración es de gran importancia en los sistemas de FIV porcina e incluso algunos investigadores abogan por ajustar de forma más precisa el número de espermatozoides expresándose en términos de *ratio* espermatozoides/ovocito (Rath y Niemann, 1997).

Por último, el análisis de las diferencias entre las condiciones *in vivo* y las del laboratorio parece ser uno de los posibles caminos para un futuro deslance positivo. En este sentido nos encontramos, por una parte, con la distinta composición de los medios de cultivo artificiales frente al medio de cultivo fisiológico (el fluido oviductal) y, por otra, con el microambiente celular que rodea a los gametos en el oviducto y que no se imita en el laboratorio. La investigación de las condiciones que rodean al momento de la FIV y la comparación con los sucesos *in vivo* arrojaría pistas cruciales sobre el comportamiento y necesidades de los gametos y así se resolverían, o al menos se minimizarían, problemas como el de la capacitación espermática, la polispermia o el desarrollo embrionario. Además, se podría decir que es necesaria la realización de estos estudios *in vitro* con semen crioconservado por las numerosas ventajas que presenta el uso repetido de espermatozoides con las mismas características para FIV (comparación de resultados entre distintos laboratorios, eliminación de la variabilidad entre eyaculados, etc). Hace ya más de una década que Nagai et al. (1988) observaron con éxito la capacidad de los ovocitos porcinos (madurados *in vivo* e *in vitro*) de ser penetrados *in vitro* por espermatozoides crioconservados de epidídimo y, recientemente, Rath y Niemann (1997) encontraron mayores ventajas en el empleo de espermatozoides epididimarios frente a eyaculados procedentes del mismo verraco. Sin embargo, hay que tener en cuenta el daño celular que sufren los espermatozoides en el proceso de congelación-descongelación lo que puede alterar las condiciones de fecundación (Holt, 2000; Watson, 2000).

2.2 POSIBLES VÍAS DE ABORDAR EL PROBLEMA

Una vez planteada la situación actual de la FIV en la especie porcina, podemos decir que las posibles vías de profundizar en la problemática implicarían la realización de nuevos trabajos a nivel bioquímico y a nivel celular. Aunque en este estudio nos hemos planteado ahondar en el apartado celular, hemos considerado oportuno realizar igualmente un breve análisis de las investigaciones a nivel bioquímico para una mejor comprensión del tema.

2.2.1 Estudios a nivel bioquímico y/o molecular

Dentro de este apartado incluiremos tanto el fluido oviductal, como medio fisiológico donde acontece la fecundación y el desarrollo embrionario temprano, como los medios de cultivo empleados en el laboratorio.

2.2.1.1 Fluido oviductal

El oviducto no es simplemente un conducto por donde pasan los ovocitos y espermatozoides sino que además proporciona el medio ambiente adecuado para los gametos y cigotos en desarrollo gracias a su fluido luminal, el fluido oviductal (FO; Beier, 1974). Debido a que los datos en porcino no son numerosos, en este apartado nos referiremos a mamíferos en general.

Los análisis químicos indican que el FO es una compleja mezcla de constituyentes derivados del plasma sanguíneo, a través de una trasudación selectiva, y de proteínas oviductales específicas (Beier, 1974; Harper, 1988; Leese, 1988), aunque no deben olvidarse otras fuentes procedentes del contenido de los folículos de Graaf liberado en la ovulación, el fluido peritoneal en especies carentes de bolsa ovárica y el fluido uterino cuando el movimiento de reflujo del líquido a través de la unión útero tubárica es posible (Hunter, 1988). De este modo, el FO no es únicamente un ultrafiltrado de plasma sino que ciertos componentes están presentes en diferentes concentraciones a aquellos del plasma. Además, su composición varía según el estadio del ciclo ovárico, estando controlada por las hormonas ováricas esteroides, por lo que al investigar la composición bioquímica del FO durante las distintas fases del ciclo estral y los estadios de preimplantación, se observa un espectro de patrones tiempo-específicos diferentes existiendo diferencias cíclicas (Cox y Leese, 1997; Hunter, 1988). Estas modificaciones se observan igualmente en las características

fisicoquímicas del FO como son el volumen, pH, osmolaridad, viscosidad, etc. Estas fluctuaciones no sólo ocurren dentro del oviducto en su conjunto sino que ya a finales de los 70, Biggers y Borland (1976) realizaron análisis regionales del FO demostrando que, en efecto, existen distintos microambientes dentro de este órgano.

Dentro de los componentes del FO podemos hablar, de una forma simplificada, de compuestos orgánicos (proteínas, enzimas, aminoácidos, compuestos energéticos y hormonas) y electrolitos (iones).

Las **proteínas** han sido analizadas básicamente mediante electroforesis observándose que la mayoría de los constituyentes proteicos del FO son consecuencia de un trasudado de suero sanguíneo (Beier, 1974; Hunter, 1988) aunque existen ciertas proteínas específicas de la secreción oviductal, de tipo glicoproteico, que son de una gran importancia como veremos más adelante. Aunque las proteínas plasmáticas explican la mayoría del contenido proteico del FO, su concentración es usualmente baja si se compara con la de la sangre, suponiendo sólo el 5-10% de la encontrada en suero (Hunter, 1988; Leese 1988), alcanzando su máximo en el momento de la ovulación y consistiendo predominantemente en albúmina, β -globulina y γ -globulina (Harper, 1988). Oliphant et al. (1978) mostraron que la capacidad de las proteínas séricas de entrar en el lumen oviductal varía inversamente con su tamaño molecular.

De las proteínas sintetizadas en el propio oviducto, se ha podido demostrar que el epitelio oviductal de coneja sintetiza en cultivo un pequeño número de glicoproteínas sulfatadas idénticas a las encontradas en el FO (Barr y Oliphant, 1981). El hecho de que pudieran ser sintetizadas por un epitelio aislado indica su origen no-plasmático en el FO y los resultados sugieren que las glicoproteínas están presentes en los gránulos secretorios dentro de las células secretoras estando su formación controlada por el estradiol y su liberación por la progesterona (Leese, 1988).

Por lo que se refiere a las **enzimas**, son diversas las que pueden detectarse histoquímicamente en el epitelio oviductal (Fredricsson, 1969) y entre las que podrían jugar un papel importante en los sucesos de fecundación se han identificado la fosfatasa alcalina, amilasa y lactato deshidrogenasa en la especie humana; diesterasas y lisozimas en coneja o inhibidores de las proteasas en mona *rhesus* y coneja (Aitken, 1979; Mastroianni y Go, 1979). En comparación con sus concentraciones en sangre, muchas enzimas se encuentran a menores niveles en el FO (Hunter, 1988).

En muchas especies, la concentración de **aminoácidos** presentes en el FO es inferior a la del plasma con excepción de la yegua (Leese, 1988). Tanto en la cerda (Iritani et al., 1974) como en la oveja (Menezo, 1975) el aminoácido predominante en el FO es la glicina.

Se ha documentado un amplio rango de **sustratos energéticos** en el FO y entre los más frecuentemente dilucidados en animales de experimentación se encuentran el piruvato, el lactato, la glucosa y el glucógeno. Las concentraciones de estos nutrientes en el FO están todas considerablemente por debajo de sus concentraciones en plasma lo que sugiere que su paso a través del oviducto se establece por difusión más que por transporte activo (Leese, 1988). Se piensa que estos componentes están involucrados en el soporte metabólico de los gametos y/o de los embriones en el estadio de preimplantación (Brinster, 1973; Biggers y Borland, 1976). Al igual que el resto de componentes no electrolitos, los sustratos energéticos varían en su concentración en las distintas fases del ciclo estral.

Muchas de las mediciones, hasta la fecha, sobre los mensajeros químicos presentes en el FO han detectado **hormonas** esteroides y prostaglandinas, pero hay evidencias también sobre la existencia de prolactina, gonadotropinas y varios péptidos hormonales (Hunter, 1988). Evidentemente su concentración varía dependiendo del ciclo estral pero la fuente de hormonas esteroides (y otras) en el FO está abierta a debate. Aunque es probable que estas pequeñas moléculas deriven principalmente del trasudado sanguíneo, las contribuciones del fluido peritoneal, fluido folicular ovárico, células de la granulosa y de los propios embriones no pueden ser olvidadas (Hunter, 1988). En cuanto a su papel en el FO, ha sido ampliamente documentado que los esteroides influyen directamente sobre los espermatozoides (Ericsson et al., 1967) e igualmente en el desarrollo de los embriones, al menos durante el cultivo *in vitro* (Edwards, 1980).

Por su parte, los **electrolitos** son los principales responsables de mantener la osmolaridad y pH del FO, pero algunos aniones y cationes podrían tener funciones específicas. Por ejemplo, el hecho de que durante los primeros días de la implantación embrionaria exista un medio ambiente con altos niveles de K^+ y bicarbonato ha sido comentado con frecuencia (revisado por Leese, 1988). Las mediciones de iones calcio, sodio, potasio y otros con espectrofotometría de absorción atómica presentan evidencias claras de que sus concentraciones en el FO son diferentes al suero sanguíneo. Como podría esperarse, el Na^+ es el principal catión y el Cl^- el principal anión (Hunter, 1988) y, aunque ambos elementos están en menor concentración que en el suero, el contenido de Ca^{2+} en el FO de coneja, mono *rhesus* y mujer aumenta

después de la ovulación (Holmdahl y Mastroianni, 1965; Lippes, 1979). En general, el FO de las distintas especies posee una concentración de K^+ significativamente mayor y una concentración de Ca^{2+} significativamente menor que el plasma sanguíneo (Leese, 1988). Burkman et al. (1984) opinan que esta elevada concentración de iones potasio podría estar involucrada en la inhibición de la motilidad espermática en la parte baja del istmo de la coneja mientras que Murdoch y White (1971) encontraron que las elevadas concentraciones de K^+ disminuyen el consumo de oxígeno y la glicolisis de los espermatozoides de carnero.

En bovino, Grippo et al. (1992) destacan que las máximas concentraciones de Ca^{2+} en el FO del istmo y de la ampolla se alcanzan en los días de estro y de ovulación. Por su parte el Mg^{2+} fue significativamente menor en el FO que en el suero en todas las fases del ciclo estral mientras que la concentración de Na^+ en el FO no difiere de la hallada en suero. Van Winkle et al. (1985) consideraron que la pequeña diferencia en la concentración de Na^+ en la ampolla oviductal comparada con la del istmo es suficiente para influir en la incorporación de aminoácidos por los embriones tempranos de ratona.

En porcino, el análisis de Iritani et al. (1974) a partir de FO recogido por canulación de los oviductos detectó como elementos inorgánicos mayoritarios el sodio, calcio y cloro y como minoritarios el potasio, magnesio y fósforo. Estos autores sugirieron la importancia de referirse a estos iones según sus *ratios* (K^+/Na^+ o Ca^{2+}/Mg^{2+}) más que como elementos aislados. Así, el *ratio* molar K^+/Na^+ es un importante factor para la capacitación de espermatozoides de rata ya que la preincubación de espermatozoides epididimarios de esta especie en un medio con un *ratio* K^+/Na^+ alto produjo buenos resultados de FIV (revisado por Iritani et al., 1974). Revisando la literatura nos encontramos con el *ratio* molar K^+/Na^+ en el FO de algunas especies: 0'13 en coneja (Hamner y Williams, 1965), 0'34 en oveja en estro (Rowan y Goode, 1967) y entre 0'26 y 0'8 en la cerda (Iritani et al., 1974; Romar et al., 1997). Con respecto al *ratio* Ca^{2+}/Mg^{2+} se ha observado que la capacidad de inducir la monospermia *in vitro* es mayor en aquellas especies (humana, ratón y oveja) con valores relativamente bajos. La especie porcina, clásicamente de elevada polispermia *in vitro*, alcanza un *ratio* Ca^{2+}/Mg^{2+} de 10'7 (Iritani et al., 1974).

Por su parte, las concentraciones de fosfato y bicarbonato son más bajas que las de la sangre, aunque el nivel de bicarbonato del FO se incrementa en ovejas durante el estro (Restall y Wales, 1966). Esta modificación del bicarbonato podría tener una influencia importante sobre la respiración, capacitación y posterior hiperactivación del espermatozoide. En la coneja, el ión bicarbonato en el FO supera

la concentración del plasma sanguíneo y ha sido asignado como responsable de la dispersión de las células de la corona alrededor de los ovocitos recién liberados (Stambaugh et al., 1969). El bicarbonato en el FO de mona *rhesus* podría servir para un propósito similar ya que su concentración también aumenta tras la ovulación (Maas et al., 1976).

El **pH** presumible del FO se ha registrado en una amplia variedad de modelos animales y los valores son del mismo orden. Las fluctuaciones en la concentración de bicarbonato en el fluido oviductal, inducidas por la acción de las hormonas esteroides ováricas, son una importante causa del cambio en el pH y son modificadas por la pérdida de CO₂ durante la recogida de la muestra (Hunter 1988). Evitando éstas, las mediciones en conejas en estro dieron un valor de pH de 7'5 (Brackett y Mastroianni, 1974) y en mona *rhesus* de 7'1-7'3 en la fase folicular con un incremento súbito a 7'5-8'0 durante la ovulación y la fase luteal (Maas et al., 1979). El FO de cerdas en estro ha registrado un valor de pH de 7'9 (Engle et al., 1968) o de 8'1 justo antes de la ovulación (Hunter, 1988).

El **volumen** de FO es mayor en el momento en el que los gametos o los embriones están presentes en los oviductos (Hunter, 1988) y en porcino los *ratios* de secreción aumentan 1 ó 2 días antes del estro alcanzando el máximo durante el periodo de 24h después del inicio del estro para a continuación descender (Iritani et al., 1974; Wiseman et al., 1992).

Por último, los datos sobre la **osmolaridad** del FO publicados en la coneja refieren unos valores en estro de 302 a 310 mOsm (Stambaugh et al., 1969).

2.2.1.2 Medios de cultivo para fecundación *in vitro*

La composición general de los medios de cultivo para FIV no difiere drásticamente de la relatada para el FO pero es quizá la concentración y combinación de algunos elementos lo que les distingue. Clásicamente el medio de FIV porcina ha sido el medio comercial TCM-199 aunque desde hace unos años la tendencia viene siendo preparar en el laboratorio medios definidos más simples (por ejemplo, TBM, TALP, BOM, etc.) en un intento de controlar mejor la composición exacta y de evitar la formulación excesiva de componentes. Aunque los medios de cultivo empleados han sido numerosos, todos coinciden en su composición con ciertos elementos básicos que se podrían clasificar, brevemente, en una fuente de componentes orgánicos (proteínas, aminoácidos, sustratos energéticos), componentes electrolitos y otros

suplementos, que han ido variando dependiendo sobre todo del tipo de semen empleado para la FIV.

Se han desarrollado muchos sistemas exitosos para la FIV de ovocitos porcinos madurados *in vivo* o *in vitro* y con espermatozoides de distinta procedencia (Nagai et al., 1988; Wang et al., 1991; Zheng et al., 1992; Kikuchi et al., 1993), pero en todos ellos el medio de FIV contenía una macromolécula proteica como la albúmina sérica bovina (BSA, Yoshida et al., 1993a), el alcohol de polivinilo o las contenidas en el suero fetal bovino (FCS, Funahashi y Day, 1993a). Aunque no se han llevado a cabo estudios rigurosos sobre si tales proteínas son necesarias para inducir la capacitación del semen de verraco y la penetración de ovocitos *in vitro*, Funahashi y Day (1993c) indicaron que la penetración de ovocitos porcinos, rodeados por las células del cúmulus, con semen fresco eyaculado es menor en un medio sin proteínas.

De forma rutinaria, los medios de FIV no se suplementan con **aminoácidos**, pero Xia et al. (1995) encontraron que la adición de 0'5 mM de glicina al medio de FIV porcina aumenta el porcentaje de división embrionaria independientemente de la presencia o no de células oviductales. Es curioso reseñar que la glicina es el aminoácido de mayor concentración en el FO porcino (Iritani et al., 1974).

Entre los **sustratos energéticos** más empleados en los medios de FIV están la glucosa, el piruvato sódico y el lactato cálcico. Básicamente, su función es actuar como fuente de energía en los procesos de capacitación espermática y fecundación. Lim et al. (1993) observaron que la presencia o ausencia de glucosa en el medio de FIV no parecía tener un efecto sobre la penetración de ovocitos bovinos ni sobre la división embrionaria hasta las 72 horas postfecundación.

En cuanto a los **componentes electrolitos** los estudios *in vitro* han demostrado que varios cationes son vitales para la capacitación espermática, la reacción acrosómica, la motilidad y la fecundación. El Ca^{2+} es uno de los iones más importantes y su presencia provoca cambios significativos en la motilidad de los espermatozoides de ratón (Neill y Olds-Clarke, 1987) y es necesario para la unión de estos espermatozoides a la ZP antes de la penetración del ovocito (Saling et al., 1978) así como para la fusión espermatozoide-ovocito en distintas especies (Yanagimachi, 1978). Además, juega un papel importante en muchos otros acontecimientos excitóticos, entre ellos la liberación del contenido de los gránulos corticales al espacio perivitelino. Se ha demostrado que el Ca^{2+} extracelular es necesario para la capacitación *in vitro* de semen bovino con glicosaminoglicanos (Handrow et al., 1989) y para la capacitación en espermatozoides de ratón (Fraser, 1982), hámster

(Yanagimachi, 1982) y hombre (Stock y Fraser, 1989). Mientras que los niveles de Ca^{2+} se sitúan entre 1-3 mM en el oviducto de varias especies (Borland et al., 1977), el Mg^{2+} puede variar ampliamente. Este último puede competir con el Ca^{2+} en su acción (Rogers y Yanagimachi, 1976) por lo que el *ratio* $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ podría ser importante no sólo para los acontecimientos que preceden a la fecundación (Fraser, 1984), sino también en los mecanismos de bloqueo de la polispermia controlando la disponibilidad del Ca^{2+} . Se sabe que las especies con *ratios* $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ bajos en el FO tienen una mayor capacidad de inducir la monospermia *in vitro*. Este *ratio* en el medio de FIV porcina más empleado, el TCM-199, es de 5'9 (Cran y Cheng, 1986), aunque en el FO porcino, como ya hemos referido, se han publicado valores de 10'7 (Iritani et al., 1974).

Por su parte, el Ca^{2+} , Na^+ y K^+ extracelulares son esenciales en semen de cobaya para inducir la reacción de zona (Yoshimatsu y Yanagimachi, 1988) y el K^+ extracelular también interviene en la reacción acrosómica (Yoshimatsu y Yanagimachi, 1988) y fecundación de hámster y ratón (Bize y Santander, 1985; Fraser 1983), así como en la fecundación del cobaya (Rogers y Yanagimachi, 1975). Con respecto a otros electrolitos no hay estudios definitivos que aporten datos comparativos de las concentraciones en el medio de FIV vs. FO.

En cuanto a otros iones importantes, Wang et al. (1995) estudiaron el efecto del bicarbonato observando que al incrementar su concentración se aumentaban los porcentajes de penetración lo que indica que el bicarbonato tiene otro papel más aparte de ser una molécula tamponadora del medio. En porcino, su omisión en el medio de cultivo disminuye la capacidad de los espermatozoides de adherirse a las proteínas de la zona pelúcida del ovocito (Harkema et al., 1998) y en el hámster inhibe la inducción de la hipermotilidad de las células espermáticas (Boatman y Robbins, 1991).

El medio de FIV se suele completar con otros **suplementos**, algunos de ellos, como la cafeína, desde prácticamente los primeros trabajos sobre FIV porcina. Muchos de estos componentes no se encuentran de forma fisiológica en el FO y otros típicamente utilizados en la FIV de vacuno, como la heparina, también se han introducido en la FIV para la especie porcina.

La **cafeína** ha sido empleada por varios investigadores en una concentración de 2 mM (Nagai et al., 1988; Naito et al., 1988). Se sabe que la cafeína incrementa la capacidad de los espermatozoides para fecundar (revisado por Niwa, 1993) y se ha sugerido que mejora y prolonga la motilidad de los espermatozoides de toro y verraco (Garbers et al., 1971, 1973) aunque también aumenta la polispermia (Wang et al.,

1991). En porcino se ha mostrado que el semen eyaculado conservado refrigerado (Mattioli et al., 1989) o el semen de epidídimo (Nagai et al., 1984) son capaces de fecundar ovocitos *in vitro* en medios sin cafeína; trabajos posteriores han apuntado que el semen eyaculado congelado-descongelado no es capaz de hacerlo en un medio sin, al menos, 5 mM de cafeína (Wang et al., 1991). En general, parece que la cafeína en ausencia de cualquier macromolécula (tipo alcohol de polivinilo o FCS) es suficiente por sí sola para apoyar todos los cambios necesarios para la completa función espermática en verraco (Wang et al., 1995).

La **heparina** se ha usado para estimular la capacitación de espermatozoides de vacuno *in vitro* (Parrish et al., 1988) y se han publicado efectos sinérgicos entre la cafeína y la heparina para inducir la capacitación en espermatozoides de toro (Niwa y Ohgoda, 1988). Sin embargo, Kim et al. (1997) no encontraron que la heparina mejorara la penetración *in vitro* de ovocitos porcinos con semen congelado eyaculado e incluso Wang et al. (1991) mostraron que la heparina inhibe la eficacia de la cafeína en promover la penetración de ovocitos porcinos. Por tanto, a diferencia del bovino, Kim et al. (1997) han sugerido que el glicosaminoglicano tipo heparina podría no ser un componente de la secreción oviductal implicado en la capacitación espermática en el cerdo ya que la adición de heparina al medio de FIV incrementa la reacción acrosómica pero no el grado de capacitación espermática.

También el **FO** se ha utilizado como aditivo de los medios de FIV tanto como fuente proteica como por su aporte hormonal fisiológico. Así, Kim et al. (1996) encontraron que la adición de FO al medio de FIV porcina en concentraciones del 1 al 10% disminuye la penetración espermática y el número medio de espermatozoides por ovocito. Igualmente el FO combinado con heparina ejerce el mismo efecto (Kim et al., 1997).

Quizás uno de los últimos aditivos empleados sea el **ácido hialurónico**, que añadido al medio de FIV aumenta la penetración monospermica en ovocitos desnudos empleando semen eyaculado crioconservado (Suzuki et al., 2000). Los glicosaminoglicanos, incluyendo el ácido hialurónico y la heparina, están presentes en el FO. Se ha estimado que su concentración en el sitio de la fecundación *in vivo* se sitúa entre 0'04-1'83 mg/ml (Kano et al., 1998) y en su estudio, Suzuki et al. (2000) utilizaron una concentración de 0'5 mg/ml, lo que significa que se han empleado concentraciones fisiológicas. Además, hay que destacar que el ácido hialurónico es secretado durante la MIV por los complejos células del *cumulus oophorus*-ovocito porcinos (Rodríguez-Martínez et al., 1998). El papel del ácido hialurónico durante la incubación espermatozoide-ovocito es desconocido, por lo que se hace necesario

determinar sus efectos y los de las células del cúmulus durante la FIV (Suzuki et al., 2000). También entre los aditivos ensayados recientemente está la **adenosina** que podría desplazar a la cafeína en los medios de cultivo ya que se ha observado que mejora la monospermia de los espermatozoides de verraco crioconservados (Funahashi y Nagai, 2001).

Por último, detalles que pueden parecer poco importantes en los sistemas de FIV pueden arrojar resultados interesantes. Así por ejemplo, Coy et al. (1993b) observaron un menor número de espermatozoides por ovocito empleando un **volúmen** de medio de FIV pequeño (400 μ l) y, posteriormente, Carolan et al. (1995) sugirieron que el empleo de volúmenes mucho mayores que los que están presentes en el tracto reproductivo podrían diluir ciertos factores autocrinos secretados por los gametos o los embriones. Otro detalle a tener en cuenta es el **pH** ya que experimentos con semen crioconservado indicaron que el pH del medio influye sobre los porcentajes de penetración *in vitro* en los ovocitos desnudos: un mismo medio a pH de 7'8 (Wang et al., 1994) proporciona mayores porcentajes de penetración que a pH 7'4 (Wang et al., 1992). Recordemos que el pH del FO cercano a la ovulación se sitúa entre 7'9 y 8'1 (Engle et al., 1968; Hunter, 1988).

Resumiendo, en vista de las variadas diferencias entre el medio ambiente del lumen oviductal y el medio en una placa de cultivo no deberíamos sorprendernos de que los resultados con los procedimientos convencionales de FIV sean medio-bajos. Aunque, como hemos visto, existen numerosos experimentos sobre la composición del FO, hay que destacar que la mayoría de los realizados en porcino datan de los años 70 y con resultados variables según los procedimientos de recogida de muestras. Tal y como advierte Hunter (1988), ninguno de estos estudios es estrictamente fisiológico, por lo que estas interesantes observaciones deben ser tomadas con precaución y realizar futuras mediciones con técnicas de mayor precisión y exactitud. Sorprendentemente, en la cerda el estudio más detallado fue llevado a cabo por Iritani et al. hace casi 30 años sin que desde entonces se hayan retomado con profundidad los estudios sobre la composición del medio fisiológico de fecundación, el fluido oviductal. En rumiantes, la formulación de medios de cultivo más fisiológicos está dando muy buenos resultados. Uno de estos medios es el fluido oviductal sintético (SOF). Desarrollado hace más de 20 años, basado en el análisis del fluido oviductal de oveja (Tervit et al., 1972), y posteriormente modificado (Takagi et al., 1991), el SOF es usado comúnmente como medio para el cultivo de embriones (Walker et al., 1989) y se ha mostrado eficaz para el cultivo de embriones bovinos después de la MIV y la FIV (Takahashi y First, 1992).

Así pues, el análisis de todo este conjunto de parámetros tiene como resultado un punto concluyente: los gametos y los embriones necesitan para su correcto desarrollo unas condiciones precisas y estrictas en cuanto a la concentración de los distintos sustratos y a las variaciones fisicoquímicas en el ambiente que los rodea durante el periodo pre y postfecundación.

2.2.2 Estudios a nivel celular

La segunda posibilidad en la resolución de la problemática de la FIV porcina sería la de estudiar el nivel celular considerando tanto los gametos (ovocito y espermatozoide) como las células del *cumulus oophorus* y las oviductales.

2.2.2.1 Ovocito

La maduración de los ovocitos de mamífero incluye una etapa de crecimiento y otra de maduración nuclear y citoplasmática, ambas necesarias para la posterior fecundación y desarrollo embrionario normales (Hafez, 1989).

Durante los primeros estadios de la gestación las células germinales primordiales del ovario del embrión se diferencian, por sucesivas divisiones mitóticas, en ovogonias que a su vez se transforman en ovocitos primarios mediante la primera división meiótica, por la que reducirán su número de cromosomas a estado haploide (revisado por Labadía, 1995). Sin embargo, la meiosis se detiene al alcanzar el estadio de diplotene difuso de la profase I (estado de dictiatio), en lo que se conoce como primera detención de la meiosis. Esta detención o arresto meiótico es mantenida por un sistema múltiple de control en el que están implicados el AMPc (Schultz, 1991; Mattioli, 1994) y otros factores (Thibault et al., 1987). En este estadio los ovocitos están rodeados por una capa de células epiteliales (foliculares) lisas no proliferativas que reciben el nombre de células pregranulosas y que ejercen un efecto inhibitor sobre la meiosis y el crecimiento del folículo.

El periodo de crecimiento del folículo ovárico y del ovocito se caracteriza por ser una fase de síntesis proteica intensiva y de almacenamiento de macromoléculas (Moor et al., 1990). Las primeras modificaciones morfológicas en los folículos primarios son un aumento del volumen del ovocito, en completa ausencia de división celular del mismo, acompañado de una hiperplasia e hipertrofia de las células granulosas. Cuando estas células alcanzan un número elevado, y como respuesta a la FSH, se

forma una cavidad en el espacio extracelular, el *antrum*, repleta de fluido folicular (Canipari, 1994). La meiosis iniciada por el ovocito primario no se reanuda hasta que el folículo se desarrolle totalmente y se produzca la ovulación, cuando el animal llegue a la pubertad por lo que, dependiendo de la especie, el ovocito puede permanecer en esta situación semanas o años (Canipari, 1994).

Como consecuencia de los altos niveles de gonadotropinas liberadas antes de la ovulación, en particular de hormona luteinizante (LH), se inician una serie de acontecimientos de diferenciación que prepararán al ovocito para la fecundación y el desarrollo temprano (Moor et al., 1990). Estas transformaciones incluyen alteraciones específicas en la esteroidogénesis folicular, cambios en el complejo células del *cumulus oophorus*-ovocito, reversión del efecto del inhibidor meiótico intrafolicular y reanudación de la meiosis (Motlik et al., 1986; Moor et al., 1990). El ovocito evolucionará hasta metafase II, estadio en el que es ovulado, produciéndose la segunda reanudación de la meiosis mediante la activación desencadenada por el espermatozoide.

Bajo condiciones *in vitro* la maduración nuclear y citoplasmática se ha realizado con distintos protocolos en los ovocitos porcinos. Entre los medios empleados se pueden citar el TCM-199 (Mattioli et al., 1989), Whitten's (Funahashi et al., 1994), Waymouth (Yoshida et al., 1992), TLP (Yoshida et al., 1992) o el NCSU (Wang et al., 1997a); siendo este último el de elección por sus buenos resultados en el posterior desarrollo embrionario. El periodo de MIV de los ovocitos porcinos oscila entre un mínimo de 36 horas (Yoshida et al., 1990) y un máximo de 48 (Iwasaki et al., 1999) o incluso 50 horas (Kim et al., 1998). El cultivo se realiza a 38'5°C en una atmósfera saturada de humedad y un 5% de CO₂ en aire. Generalmente el suplemento hormonal es a base de PMSG, HCG y estradiol que actualmente se mantienen sólo durante las primeras 20-22 horas de cultivo (Funahashi y Day, 1993b). Podemos afirmar que con las técnicas actuales, la MIV, al menos a nivel nuclear, ha alcanzado resultados prácticamente igual de efectivos que la maduración *in vivo*.

Junto a las modificaciones a nivel nuclear, en el ovocito también acontecen cambios en la zona pelúcida y a nivel citoplasmático. La maduración citoplasmática implica una resituación de orgánulos intracelulares como las mitocondrias (Cran, 1985; Thibault et al., 1987), los gránulos corticales (Cran y Cheng, 1986) y una reprogramación de la síntesis proteica.

La **zona pelúcida** (ZP) es una cubierta extracelular glicoproteica que rodea a los ovocitos de mamíferos, apareciendo durante el crecimiento de los mismos e incrementando su grosor conforme éstos aumentan su diámetro. La aparición del material de la ZP en el espacio perivitelino está correlacionada con el inicio del crecimiento del ovocito. Aquellos que no están creciendo no tienen ZP (revisado por Wassarman, 1988a) ya que los componentes proteicos de la ZP son sintetizados y secretados por el ovocito en crecimiento. En la especie porcina, la ZP está compuesta por un 19% de carbohidratos y un 71% de proteínas en forma de glicoproteínas complejas (Dunbar et al., 1980; Hedrick y Wardrip, 1987). En porcino, estas últimas se clasifican en cuatro familias: ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 (Wassarman, 1998b) y su composición varía durante el transporte del ovocito por el oviducto (Brown y Cheng, 1986; Hedrick et al., 1987). Entre las funciones de la ZP podemos citar la regulación osmótica (Bronson y Mc Laren, 1970), la unión del espermatozoide (Sacco et al., 1984), la inducción de la reacción acrosómica (Berger et al., 1989), el bloqueo de la polispermia (Braden et al., 1954), la contención de los blastómeros (Modlinski, 1970) y la mejora de la supervivencia del ovocito y el embrión en el oviducto (revisado por Dumont y Brummett, 1985).

La ZP se puede disolver mediante la acción de distintos agentes como soluciones ácidas o básicas, calor, proteasas o agentes reductores. *In vitro* se han realizado ensayos de digestión de la ZP con distintas soluciones proteolíticas (tripsina, pronasa, combinaciones de ambas, etc.), con el objetivo de conocer la resistencia que ofrecería la zona a la entrada de los espermatozoides. Según Wassarman (1988a) la zona de los ovocitos fecundados es considerablemente más insoluble (“dura”) que la de los no fecundados. De Felici y Siracusa (1982) trabajando con ovocitos de ratón desnudos reportaron un endurecimiento espontáneo de la ZP durante la MIV y, posteriormente, Gianfortoni y Gulyas (1985) encontraron una correlación entre el endurecimiento de la ZP en cultivo y el descenso en los porcentajes de fecundación. Se ha sugerido que las células del *cumulus oophorus* podrían reducir el grado de endurecimiento de la ZP que se produce de forma espontánea durante el cultivo (De Felici y Siracusa, 1982).

En ovocitos bovinos madurados *in vivo*, Broermann et al. (1989) reportaron que la ZP de los ovocitos en contacto con secreciones oviductales es mucho más resistente (24 horas) que la de los ovocitos foliculares (6 minutos) y que esta resistencia disminuye después de que el embrión alcanza el útero. En ovocitos porcinos, Kim et al. (1996) observaron una mayor resistencia de la ZP a la digestión con pronasa cuando éstos eran precultivados durante 1'5 horas en un medio con un 30% de FO incrementándose aquella de 1'2 a 6'4 minutos. Revisando la bibliografía

encontramos resultados diferentes entre los investigadores que podrían deberse a las distintas temperaturas empleadas, 22°C (Kim et al., 1996; Kouba et al., 2000) ó 37°C (Broermann et al., 1989); al tipo de proteasa utilizada, pronasa sola (Kim et al., 1996) o combinada con tripsina (Broermann et al., 1989) o incluso a la forma de expresión de los resultados (media \pm SEM o mediana). Uno de los factores que interviene en los resultados de estos ensayos es el propio grosor de la ZP, entre 2 y 25 μm entre los ovocitos de las distintas especies de mamíferos, lo que está directamente relacionado con el contenido proteico de la misma (Wassarman, 1988a). En porcino, Wang et al. (1998) han observado que este parámetro varía entre los ovocitos madurados *in vitro* e *in vivo*, siendo mayor en estos últimos (14'9 vs. 17'9 μm). Funahashi et al. (2000) también observaron un mayor grosor de la ZP en los ovocitos ovulados frente a los madurados *in vitro* (5'15 vs. 6'68 μm). Por el contrario, el número de pequeñas depresiones u "orificios" sobre la superficie de la ZP, según estos mismos autores, es mayor en los ovocitos procedentes de MIV (50/ μm^2) que en los ovulados (7'1/ μm^2).

Otro de los factores que puede provocar un endurecimiento espontáneo de la ZP es la manipulación de los ovocitos durante su denudación. Sin embargo, Chian et al. (1994) en su estudio eliminaron el cúmulus de los ovocitos después de la MIV mediante un tratamiento con hialuronidasa y pases repetidos a través de una pipeta de pequeño diámetro sin que al parecer esta manipulación indujera un endurecimiento de la ZP. Por ello, estos autores sugieren que el posible endurecimiento tras denudar mediante pipeteo y tratamiento con hialuronidasa puede ser ignorado en los experimentos.

En resumen, la ZP es una estructura de gran importancia en la fecundación y su composición y características *in vivo* e *in vitro* parecen ser muy diferentes, lo que puede influir en el rendimiento final de la FIV.

Los **gránulos corticales** (GC) representan una forma especial de lisosomas primarios esféricos, limitados por una membrana, con un tamaño variable y compuestos por glicoproteínas y enzimas hidrolíticas. Son característicos de los ovocitos no penetrados de mamífero y son considerados como una de las organelas más importantes dentro del citoplasma por su implicación en la reacción de zona para prevenir la polispermia (Guraya, 1985). Además, la exocitosis de los GC es una indicación visible de la activación del ovocito aunque no sea absolutamente necesaria para el inicio del desarrollo embrionario normal (Yanagimachi, 1988). Su formación, a partir del complejo de Golgi y el retículo endoplásmico rugoso, es un proceso continuo hasta que se produce la ovulación, después de la cual este proceso se detiene (Guraya, 1985). En el caso de la coneja, la formación de los GC continúa incluso

después de la ovulación ya que su número parece incrementarse en ovocitos envejecidos (Longo, 1974). Por su parte, en la ratona, la formación de los GC se completa en el oviducto justo antes de la fecundación (Zamboni, 1970).

Aunque los estudios detallados de la formación de los GC en relación al desarrollo folicular se han llevado a cabo sólo en unas pocas especies, los GC se han observado en el momento de la ovulación en todas las especies estudiadas hasta la fecha y se sabe que la capacidad de los ovocitos para liberar los GC se desarrolla durante la maduración meiótica (Ducibella, 1991). Cuando se inicia la maduración del ovocito, los GC empiezan a situarse en el ooplasma periférico formando una monocapa por debajo de la membrana plasmática del ovocito o cerca de ella. Al final de la maduración se incrementa el número de GC (Cran, 1985) produciéndose una migración de los mismos debajo del oolema (Cran y Cheng, 1986) situándose la mayoría de ellos dentro de los primeros 4 μm aunque también hay algunos distribuidos a lo largo del citoplasma (Yoshida et al., 1993b). El contenido de los GC es liberado desde el córtex del ovocito al espacio perivitelino durante la fecundación o la activación ovocitaria, alterando las características fisicoquímicas de la ZP de tal modo que ésta se torna “refractaria” a la penetración espermática, proceso denominado “reacción de zona” (Yanagimachi, 1988).

Según Wang et al. (1997b) los ovocitos porcinos desarrollan la capacidad de liberar los GC tras la penetración por los espermatozoides, a continuación de la rotura de la vesícula germinal, aunque esta capacidad no está totalmente desarrollada hasta el estadio de metafase II. Además, la exocitosis de los GC se acompañaría de la activación nuclear sugiriendo que tanto ésta como la maduración citoplasmática son responsables de la reacción cortical. Según este mismo equipo (Wang et al., 1997a), el medio de MIV empleado no afectaría a la densidad de GC en el córtex (entre 43 y 46 GC/100 μm^2), pero sí al tipo de exocitosis, siendo el mejor medio el NCSU-23 con un 97% de ovocitos con exocitosis completa a las 12 horas de la FIV.

Debido a la naturaleza opaca del citoplasma de los ovocitos porcinos no es posible observar los GC con microscopía convencional. Por ello, los primeros estudios descriptivos de estas organelas en la especie porcina fueron con microscopía electrónica (Cran, 1985; Cran y Cheng, 1986). Más tarde, Yoshida et al. (1993b) fueron los primeros en utilizar la microscopía laser confocal y cinco lectinas distintas, conjugadas a isotiocianato de fluoresceína (FITC), para teñir los GC. El principio de la microscopía confocal se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco. Para ello se ilumina una pequeña zona de la muestra y se toma el haz luminoso que proviene del plano focal, eliminándose los haces

procedentes de los planos inferiores y superiores (Boyde, 1985). Así, este análisis no invasivo de muestras permeables superficialmente por la radiación laser incidente, permite el registro de planos ópticos virtuales, lo que revela información espacial y espectral de la muestra, no asequible mediante la microscopía óptica clásica.

En su estudio, Yoshida et al. (1993b) observaron que la lectina procedente de *Arachis hypogaeae* (PNA) conjugada a FITC es una excelente prueba molecular para la visualización microscópica de los GC en ovocitos porcinos además de ser una lectina específica para esta especie. Este estudio reveló que al teñir los ovocitos con PNA-FITC se observaban puntos fluorescentes dentro del ooplasma, de distinto tamaño e intensidades, cuya distribución durante la maduración y fecundación era enteramente consistente con la observada previamente por microscopía electrónica para los GC. Según estos mismos autores, otra ventaja de esta lectina es que no reacciona con la ZP de los ovocitos porcinos, por lo que los GC liberados al espacio perivitelino pueden ser observados sin interferencias. Con respecto a las variaciones en la densidad de la matriz de los GC, Guraya (1985) sugirió que los gránulos “oscuros” y “claros” podrían representar distintos grados de maduración, incluso aunque ambos tipos estén situados junto a la membrana plasmática, y que esta heterogeneidad podría representar algunas diferencias funcionales ya que se observa no sólo entre especies sino también dentro del mismo ovocito.

En los últimos años se han realizado algunos estudios cuantitativos sobre los GC en ovocitos fecundados y no fecundados, aunque las observaciones varían entre autores tanto en el tamaño como en el número de estas organelas. En porcino, Yoshida et al. (1993b) reportaron un diámetro medio para los GC de 160 nm y Wang et al. (1997b) clasificaron la exocitosis de los GC tras la FIV, de acuerdo a su densidad, en completa (0-1 GC/100 μm^2), parcial (1-15 GC/100 μm^2) y no exocitosis (33-67 GC/100 μm^2). Los distintos estudios sí coinciden en que los GC desaparecen tras la fecundación aunque esta salida también puede inducirse utilizando ionóforos del calcio (Cran y Cheng, 1986).

Galeati et al. (1991) apuntaron que la manipulación de los ovocitos antes de denudarlos provoca una exocitosis prematura de los GC que podría explicar la reducida penetrabilidad de los ovocitos maduros denudados. Por su parte, Wang et al. (1997a) han propuesto que puede existir una exocitosis espontánea durante la MIV de ovocitos porcinos ya que a las 46 horas de cultivo un 33% y un 8% de los ovocitos presentaban, respectivamente, una exocitosis parcial o completa, mientras que el 59% restante no la presentó. Efectivamente, un número considerable de GC son liberados mientras el ovocito está todavía en el folículo ovárico (Rousseau et al., 1977; Okada et

al., 1986) y también antes de que la fecundación tenga lugar. Actualmente, el significado biológico de esta salida “prematura” de GC no está claro. Okada et al. (1986) han postulado que esta exocitosis podría tener dos funciones: 1) contribuir a la formación del espacio perivitelino y 2) modificar ligeramente las características fisicoquímicas de la ZP y de la membrana plasmática del ovocito de tal modo que sólo un espermatozoide muy mótil pudiera penetrarlo. Sería razonable especular que la exocitosis prematura de los GC antes de la fecundación y la “explosión” en la exocitosis durante la misma actúen sinérgicamente en la protección del ovocito frente al peligro de la polispermia y/o la fecundación por un espermatozoide “débil” (Yanagimachi, 1988).

Distintos trabajos han mostrado que existen diferencias entre la reacción cortical de ovocitos madurados *in vitro* frente a los madurados *in vivo* (Cran y Cheng, 1986; Kim et al., 1996) aunque en su estudio, Yoshida et al. (1993b) observaron que la distribución de los GC en los ovocitos *in vivo* fue la misma que en los *in vitro*. Además, la distribución y morfología de las masas fluorescentes dentro del espacio perivitelino de los ovocitos maduros tras la fecundación fue la misma para la fecundación *in vitro* o *in vivo*. Por su parte, Kim et al. (1996) observaron que la incidencia de ovocitos con una reacción cortical tipo I (salida y distribución completas del contenido de los GC) es mayor en los ovocitos madurados *in vivo* y que ciertos factores de la secreción oviductal se requieren para una reacción cortical completa. Estos mismos autores observaron que el precultivo de ovocitos durante 1'5 horas en un medio con un 30% de FO aumenta la reacción cortical tipo I postulando que quizás la deposición de glicoproteínas sobre la ZP, seguida de su entrada en el espacio perivitelino, facilita una exocitosis más sincrónica de los GC o aumenta la respuesta fisiológica de la ZP al material de los GC. Efectivamente, estudios recientes empleando los actuales medios de MIV parecen indicar que los ovocitos madurados *in vitro* pueden sufrir una reacción cortical completa bajo ciertas condiciones (Wang et al., 1998), aunque el efecto del contenido de los GC sobre el control de la polispermia no parece ser el mismo que *in vivo*. Funahashi et al. (2000) han indicado muy recientemente que aunque la reacción de zona pueda parecer similar entre ovocitos madurados *in vitro* e *in vivo*, la morfología de la ZP en el momento de la penetración espermática es diferente.

Es por ello que se hace necesario, en nuestra opinión, dedicar nuevos trabajos al estudio de la reacción de zona en los distintos medios de cultivo y en presencia o ausencia de células oviductales para profundizar en el posible efecto que ambos factores ejercen sobre la ZP así como en la distribución y densidad de los GC.

2.2.2.2 Espermatozoide

El espermatozoide es el producto final de la espermatogénesis que ocurre dentro de los túbulos seminíferos en los testículos del macho. Los espermatozoides de mamíferos tienen dos estructuras principales, la cabeza y la cola o flagelo. La cabeza está mayoritariamente ocupada por el acrosoma y el núcleo, aunque también contiene componentes del citoesqueleto y una pequeña parte de citoplasma. El acrosoma se sitúa justo por debajo de la membrana plasmática, cubriendo la parte anterior de la cabeza espermática a modo de “capucha”. Éste es un gran gránulo secretor que contiene enzimas, en forma de zimógeno, esenciales para la fecundación y que son liberadas en la denominada “reacción acrosómica”. Por su parte, el flagelo contiene las fuentes energéticas y estructuras necesarias para la motilidad del espermatozoide (revisado por Eddy, 1988).

Cuando los espermatozoides de mamíferos abandonan el testículo todavía no tienen la capacidad de fecundar los ovocitos, sino que ésta se adquiere mientras se realiza el paso a través del epidídimo en lo que se conoce como “maduración epididimaria”. Entre las modificaciones funcionales observadas en este periodo se incluyen alteraciones en el metabolismo y la membrana plasmática o cambios en el patrón y efectividad de la actividad flagelar, pero una de las características más prominentes en el gameto masculino durante esta maduración es el desarrollo de la capacidad de movimiento (Yanagimachi, 1988).

Durante la eyaculación el espermatozoide entra en contacto con las secreciones de las glándulas genitales accesorias y alcanza el aparato genital femenino. En condiciones *in vivo*, durante la migración de los espermatozoides por el tracto genital femenino, ocurre la “capacitación espermática” bajo la influencia de glicosaminoglicanos como la heparina o el ácido hialurónico (Rodríguez-Martínez et al., 1998). Este proceso comprende una serie de cambios que el espermatozoide ha de sufrir antes de adquirir la capacidad de penetrar al ovocito (Austin, 1951; Chang, 1951). La capacitación va acompañada de un incremento en la fluidez de membrana con remodelación de la superficie espermática, fosforilación proteica, incremento del Ca^{2+} y pH internos así como una hiperpolarización de la membrana (revisado por Töpfer-Petersen et al., 2000). En general se acepta el concepto de capacitación como una serie de acontecimientos desestabilizantes de la membrana plasmática del espermatozoide.

En condiciones *in vivo*, el istmo juega un papel de vital importancia (Hunter y Nichol, 1988) en el proceso de capacitación. Una vez aquí, los espermatozoides porcinos generalmente hacen contacto con la superficie de las células no ciliadas con las cabezas orientadas sobre la parte superior de las microvellosidades o entre las células epiteliales observándose también contactos entre los cilios y las células espermáticas especialmente sobre la parte media del istmo (Fléchon y Hunter, 1981). En este punto permanecen en un estado quiescente y bajo unas condiciones que mantienen su viabilidad y sincronizan tanto el transporte como la capacitación (Suarez, 1998). Cercano al momento de la ovulación, los espermatozoides son liberados del epitelio del oviducto mostrando una hiperactivación con la que “nadan” hasta el lugar de la fecundación. El número medio de espermatozoides viables en el istmo es del orden de unos cuantos cientos y, en el sitio de fecundación, de unas cuantas decenas por ovocito (Hunter, 1980); así es como el oviducto porcino controla en parte, bajo condiciones *in vivo*, la polispermia. Parece ser que son el oviducto y el ovocito por sí solos los que, bajo el control hormonal correspondiente, coordinan la función espermática y la interacción entre gametos (Töpfer-Petersen et al., 2000).

Para lograr la capacitación espermática en el laboratorio, se han utilizado distintos medios de cultivo (Rath, 1992) y distintas técnicas más o menos laboriosas, normalmente todas ellas implicando algún lavado y centrifugación. Desde la técnica empleada por Pavlok (1981), con varios lavados por centrifugación y una posterior incubación de una alta concentración de espermatozoides en un medio rico en calcio, los sistemas se han simplificado bastante (Martínez et al., 1996).

En porcino, Cheng (1985), modificando la técnica anterior consiguió la primera camada de lechones procedentes de FIV capacitando el semen mediante tres lavados y preincubándolo durante 40 minutos en medio TCM-199. Este sistema fue empleado posteriormente por otros grupos de investigación (Coy et al., 1993a; Yoshida et al., 1993c) hasta que se observó que los lavados y la preincubación no eran necesarios para la penetración espermática si se empleaba un medio rico en calcio (Martínez et al., 1996). Otros autores también consiguieron descendencia viva separando los espermatozoides en un gradiente discontinuo de Percoll® (Mattioli et al., 1989). Aunque este sistema de selección de espermatozoides ha sido retirado para ensayos en la especie humana, en veterinaria sigue empleándose ya que permite la separación rápida y eficaz de espermatozoides móviles libres de componentes del plasma seminal (Ng et al., 1992). A pesar de los numerosos sistemas de capacitación, hasta la fecha no se dispone de estudios comparativos firmes sobre el rendimiento de los distintos tratamientos. Así, Grant et al. (1994) han observado que los ovocitos fecundados con espermatozoides de verraco aislados con Percoll® dan mayores porcentajes de

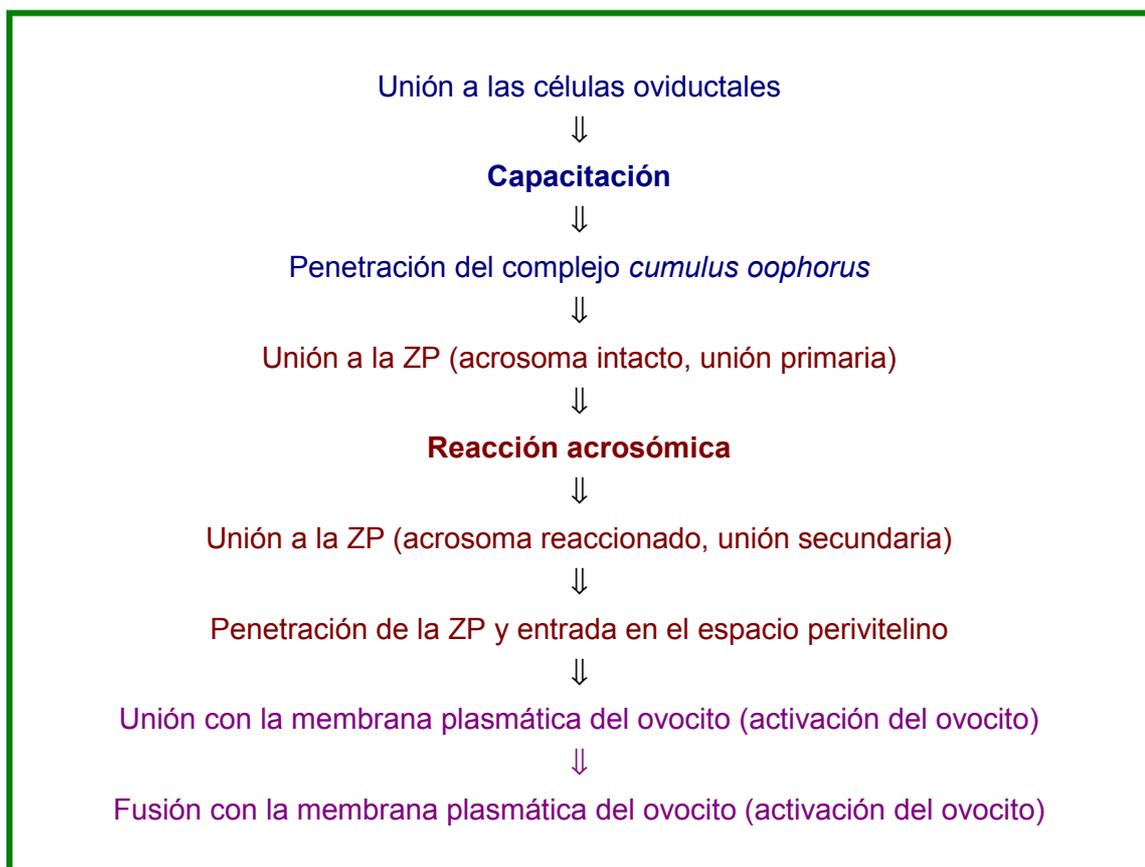
división embrionaria. Más recientemente, Tantasuparak et al. (1997) han observado que existe un efecto de la preparación del semen sobre los resultados de la FIV y tras comparar el refrigerado frente al epididimario, incubado entre 1 y 4 horas, registraron un mayor porcentaje de división embrionaria en los ovocitos fecundados con espermatozoides preincubados sólo 1 hora sin que existieran diferencias entre ambos tipos de espermatozoides.

Uno de los factores a tener en cuenta en los ensayos *in vitro* es la procedencia de los espermatozoides empleados (eyaculados o epididimarios) y su proceso de conservación (refrigerados o crioconservados). Debido a que los procedentes de epidídimo no han estado en contacto con los factores decapacitantes del plasma seminal, su proceso de capacitación es más sencillo que con los eyaculados. Como una de sus principales funciones fisiológicas, el plasma seminal protege a las células espermáticas de adquirir la capacidad fecundante final cuando migran a lo largo del tracto genital femenino (Oliphant et al., 1985, Töpfer-Petersen et al., 1995). Esta podría ser una de las posibles explicaciones para los mejores porcentajes de FIV que algunos autores han alcanzado empleando espermatozoides de epidídimo frente a eyaculados (Rath y Niemann, 1997).

Aunque la tendencia actual es emplear semen crioconservado en lugar de refrigerado, el proceso de crioconservación en sí presenta algunos inconvenientes. Wang et al. (1995) empleando espermatozoides congelados observaron que la capacitación y reacción acrosómica espontáneas ocurrían rápidamente en muchas células espermáticas probablemente dañadas por el proceso de congelación-descongelación quedando funcionalmente comprometidas. Igualmente, Watson (1996) reportó que el enfriamiento de los espermatozoides de verraco induce un aumento de la incidencia de los patrones de tipo B (espermatozoides capacitados: banda libre de fluorescencia en la región postacrosomal) tras la tinción con clortetraciclina, apoyando de este modo la idea de que la criopreservación acelera la capacitación espermática. Además la calidad de los espermatozoides congelados no viene determinada únicamente por el donante, sino también por el procedimiento de congelación (revisado por Bwanga 1991; Holt, 2000; Watson, 2000). Variaciones en la velocidad de enfriamiento y descongelación, así como en la concentración de crioprotectores pueden influenciar enormemente la calidad y viabilidad de los espermatozoides tras la descongelación (Sirard et al., 1993). No sólo el proceso de crioconservación tiene algunos inconvenientes sino que se ha constatado que durante la preincubación los espermatozoides descongelados presentan un rápido descenso en la motilidad, por lo que su tratamiento antes de la FIV ha de ser más corto que con los refrigerados (Clarke y Johnson 1987; Nagai et al., 1988).

En cualquier caso, la función final de la célula espermática es fusionarse con la membrana plasmática del ovocito, atravesando las células del cúmulus y la ZP, momento en el cual deja de ser un espermatozoide para convertirse en parte de una nueva célula, el cigoto. En estos procesos (Figura 1), bioquímicamente complejos y todavía poco conocidos, están implicadas distintas proteínas espermáticas como la PH-20 que tiene un papel bifuncional en la penetración del cúmulus y en la unión a la ZP del espermatozoide reaccionado, y la fertilina que interviene en la fusión espermatozoide-ovocito (Myles y Primakoff, 1997).

Figura 1. Secuencia de acontecimientos desde que el espermatozoide entra en el tracto genital femenino hasta que se fusiona con el ovocito (Myles y Primakoff, 1997).



Además de algunos ungulados, como la oveja y la vaca, donde el cúmulus mucificado se elimina poco después de la ovulación y los ovocitos alcanzan el sitio de fecundación sólo rodeados por la ZP, en muchas especies de mamíferos los ovocitos ovulados retienen esta masa de células del cúmulus (Hunter, 1988). Este complejo,

con cerca de 3.000 células, y la ZP conforman una barrera que los espermatozoides deben penetrar antes de poder fecundar el ovocito. En especies en las que este acercamiento ha sido estudiado con más detalle, incluyendo el hámster (Cherr et al., 1986) y el cobaya (Myles y Primakoff, 1997), se ha observado que sólo los espermatozoides con el acrosoma intacto penetran el complejo de células del cúmulus, mientras que los espermatozoides no capacitados y los reaccionados se quedan pegados en la superficie del cúmulus pero sin poder penetrar el ovocito. Este descubrimiento entraría en conflicto con el modelo que propone que serían enzimas liberadas a partir de la reacción acrosómica las que dispersan la matriz extracelular de tal modo que el espermatozoide es capaz de atravesar las células del cúmulus. Mattioli et al. (1998) mostraron que el cúmulus expandido de los ovocitos porcinos contiene algún(os) factor(es) que inducen la reacción acrosómica en los espermatozoides de verraco ya capacitados y Berger et al. (1989) mostraron a su vez que la ZP posee la capacidad de inducir la reacción acrosómica en el verraco.

Precisamente en la especie porcina, una de las causas de la polispermia podría estar en el elevado número de espermatozoides capacitados que se introducen en las placas de cultivo para FIV. Por ello, algunos autores abogan por el empleo de un número más ajustado entre espermatozoide y ovocito. Así, se han empleado *ratios* variables como 2.000 espermatozoides/ovocito con ovocitos ovulados y espermatozoides refrigerados (Rath, 1992) ó 4.000 con ovocitos denudados madurados *in vitro* (Rath et al., 1995).

Una vez los espermatozoides alcanzan la ZP se unen a ella. Su penetración es un paso crucial durante la fecundación ya que los espermatozoides que no son capaces de reconocer y unirse a las glicoproteínas de la ZP o responder a la ZP sufriendo la reacción acrosómica no fecundarán el ovocito (Töpfer-Petersen et al., 2000). En algunas especies, como por ejemplo el ratón, se ha observado *in vitro* que únicamente los espermatozoides con acrosoma intacto inician la unión primaria a la ZP, mientras que la unión secundaria ocurre aparentemente sólo cuando el espermatozoide tiene el acrosoma reaccionado sobre la ZP (Yanagimachi, 1994). En la unión a la ZP se piensa que están involucradas dos proteínas de zona diferentes: la ZP3 en la unión primaria y la ZP2 en la unión secundaria (Bleil et al., 1983, 1988). En otras especies, como por ejemplo el cobaya, los espermatozoides *in vitro* pueden iniciar la unión a la ZP con el acrosoma intacto (Myles et al., 1987) o reaccionado (Huang et al., 1981; Myles et al., 1987). La unión secundaria va seguida de la penetración de esos espermatozoides reaccionados a través de la ZP hacia el interior del espacio perivitelino (el estrecho espacio que existe en ovocitos de mamífero entre la ZP y la membrana plasmática). Después de penetrar la ZP, el espermatozoide

interactúa y se fusiona con la membrana plasmática del ovocito desencadenando la reanudación de la meiosis, la reacción de zona, la activación del ovocito y el inicio del programa de desarrollo embrionario (Yanagimachi, 1994).

Considerando las condiciones artificiales de los ensayos *in vitro* de fusión, muchos de ellos con ovocitos desnudos y sin ZP y con espermatozoides no reaccionados contactando con la membrana plasmática del ovocito, los espermatozoides *in vitro* podrían unirse al ovocito por varios mecanismos. Algunos de éstos podrían no ser funcionales a la hora de la fusión, mientras que otros podrían ser pasos intermedios o secuenciales entre el proceso de unión y fusión (Myles y Primakoff, 1997). En relación con esto, y como hemos podido constatar, los espermatozoides empleados en los sistemas de FIV configuran una fuente heterogénea de células de distinta procedencia (epidídimo frente a eyaculado) y sometida a tratamientos diversos de conservación (refrigeración o crioconservación) y capacitación. Por lo tanto, el estudio de los resultados de FIV y de los acontecimientos que ocurren durante la misma (reacción acrosómica, unión a la ZP, etc.) no puede hoy día ser comparada entre laboratorios por la diversidad de condiciones empleada. Por ello creemos que sería de gran utilidad homogeneizar o estandarizar las condiciones de estudio de modo, al menos, semejante a lo que se hace con los ovocitos (todos ellos procedentes de hembras prepúberes sacrificadas en matadero y madurados bajo condiciones más o menos estandarizadas y similares entre laboratorios).

2.2.2.3 Células del *cumulus oophorus*

En los inicios del crecimiento del folículo ovárico, el ovocito está rodeado por una capa sencilla de células aplanadas al principio, y desde cúbicas a cilíndricas después, que en su conjunto reciben el nombre de epitelio folicular (Banks, 1981). Como consecuencia de la división de las células foliculares y la formación del *antrum* en el folículo se diferencian dos poblaciones celulares con propiedades morfológicas y funcionales diferentes. Por una parte las células que revisten la pared del folículo, denominadas células de la granulosa, que forman un epitelio estratificado en contacto con la lámina basal. Son las encargadas de la luteinización del folículo ovárico, una vez producida la ovulación, así como del “arresto meiótico”, paralizando el progreso del núcleo del ovocito. Se ha observado que esta detención meiótica podría lograrse manteniendo un nivel apropiado de AMPc en el interior del ovocito (Schultz, 1991).

Por otro lado, las células que rodean al ovocito reciben el nombre de células del *cumulus oophorus*. El cúmulus lo conforman varias capas de células cilíndricas y entre sus funciones están el soporte nutricional del ovocito, la secreción de hormonas esteroideas (Canipari, 1994) o la inducción de la reacción acrosómica en el verraco (Mattioli et al., 1998). La capa de células del cúmulus más cercana a la ZP recibe el nombre de *corona radiata*. Durante su fase de crecimiento, el ovocito está íntimamente rodeado por los procesos citoplasmáticos de estas células que atraviesan la ZP en formación y terminan en la membrana plasmática del ovocito mediante uniones estrechas (Anderson y Albertini, 1976). Estas uniones permanecen durante el crecimiento y diferenciación del ovocito mediando en la transferencia de precursores metabólicos o pequeñas moléculas reguladoras en un proceso denominado “cooperación metabólica” (Gilula et al., 1978).

Durante la maduración del ovocito, se produce una transformación morfológica del *cumulus oophorus* consistente en una mucificación o expansión del mismo (Dekel y Kraizer, 1978; Eppig, 1979) hecho que se aprecia *in vivo* a las 16 horas del pico de gonadotropinas, cuando el ovocito se encuentra todavía en estadio de vesícula germinal. La expansión del cúmulus reduce el número de uniones estrechas provocando un descenso del acoplamiento iónico y de la cooperación metabólica entre estas células y el ovocito (Gilula et al., 1978; Heller y Schultz, 1980). Este efecto se observa de manera notable a las 32 horas de inducirse la maduración coincidiendo con la progresión de la meiosis hasta el estadio de metafase I (Motlik et al., 1986). Junto a esta pérdida de acoplamiento intercelular se producen cambios en el potencial de membrana del oolema del ovocito, siendo el doble en ovocitos rodeados por el cúmulus que en ovocitos desnudos (Moor et al., 1990).

Mattioli et al. (1988a) ya mostraron la importancia de la cooperación intracelular entre las células del cúmulus y los ovocitos durante la MIV para la posterior penetrabilidad y Galeati et al. (1991) también observaron que la presencia del cúmulus durante la MIV es fundamental para la penetrabilidad del ovocito porcino. Sin embargo, los estudios sobre el efecto del cúmulus en el proceso de fecundación en sí son escasos (Kikuchi et al., 1993; Ka et al., 1997). En la tabla 1 se resumen los últimos trabajos con los resultados obtenidos tras FIV con ovocitos desnudos y con cúmulus. Como podemos observar, prácticamente todos los autores coinciden en la mayor penetrabilidad de los ovocitos rodeados por su cúmulus, tanto en términos de penetración como número de espermatozoides por ovocito, salvo algunas excepciones (Suzuki et al., 1994; Ka et al., 1997).

Tabla 1. Efecto de las células del cúmulus durante la FIV sobre los resultados postfecundación. Comparación entre ovocitos denudados y COCs (complejos células del *cumulus oophorus*-ovocito). PEN (% de penetración), E/O (Número de espermatozoides por ovocito penetrado), PNM (pronúcleo masculino), POL (% de polispermia), y CE (Cultivo de embriones).

Especie	Medios de MIV/FIV	Tipo y procesado de espermatozoides	Resultados obtenidos	Equipo investigador
Porcino	TCM-199/TCM-199	Eyaculados refrigerados heterospérmicos Preincubación 4 h en TCM-199	>PEN, E/O y POL en COCs Sin CE	Zheng y Sirard, 1992
Porcino	<i>In vivo</i> /TCM-199	Eyaculados refrigerados Preincubación 40-60 min en TCM-199	>PEN y POL en COCs Sin CE	Coy et al., 1993
Porcino	TCM-199/BOm	Epididimarios congelados Preincubación 70 min en TCM-199	>PEN, PNM y POL en COCs Sin CE	Kikuchi et al., 1993
Porcino	TCM-199/BOm	Eyaculados refrigerados Preincubación 4 h en TCM-199	>PNM en COCs Sin CE	Ocampo et al., 1993
Bovino	TCM-199/DM	Eyaculados congelados Percoll®	>PEN en COCs Sin CE	Saeki et al., 1994
Porcino	Waymouth/Tyrodes	Eyaculados congelados Preincubación 90 min en Tyrodes	=PEN, E/O y POL Sin CE	Suzuki et al., 1994
Porcino	TCM-199/TCM-199	Eyaculados congelados Triple centrifugación	>PEN, >E/O y POL en COCs Sin CE	Wang et al., 1994
Bovino	TCM-199/BOm	Eyaculados congelados Doble centrifugación	>PEN y POL en COCs Sin CE	Chian et al., 1995
Porcino	TCM-199/BOm	Eyaculados congelados Triple centrifugación	>PEN, PNM y POL en COCs Sin CE	Wang et al., 1995
Porcino	Whitten's/TCM-199	Eyaculados congelados Doble centrifugación	=E/O y POL, >PNM en COCs Sin CE	Ka et al., 1997
Porcino	TCM-199/Tyrodes	Eyaculados congelados heterospérmicos Centrifugación simple	>PEN en COCs, =E/O y POL Sin CE	Suzuki et al., 2000
Porcino	Waymouth/TCM-199	Eyaculados refrigerados Doble centrifugación	=PEN, >E/O en COCs Sin CE	Campos et al., 2001

Tal y como apuntan Campos et al. (2001) el empleo de ovocitos con o sin cúmulus podría ser un factor determinante a la hora de comparar resultados de penetraciones y el tiempo que se consume en el proceso de decumulación de los ovocitos para conseguir la máxima penetrabilidad todavía tiene que probarse como un procedimiento necesario. Además, no se dispone de datos sobre la viabilidad de los embriones fecundados bajo estas circunstancias ya que en ninguno de estos estudios se realizaron pruebas de cultivo embrionario (Tabla 1).

La posible explicación del aumento de la penetrabilidad en los ovocitos con cúmulus intacto frente a ovocitos sin cúmulus la podemos encontrar en distintos trabajos. Saeki et al. (1994) en bovino mostraron que el cúmulus de ovocitos maduros ejerce un mayor efecto sobre la penetrabilidad de lo que hicieron las células del cúmulus de ovocitos inmaduros. Efectos similares podrían ocurrir en ovocitos porcinos ya que varios autores han detectado ciertas proteínas en el cúmulus de ovocitos maduros que podrían ser capaces de inducir o promover la reacción acrosómica en espermatozoides de verraco posiblemente favoreciendo la penetración espermática (Mattioli et al., 1988b,c). Es más, se sabe que las células expandidas de ovocitos maduros mejoran la motilidad espermática y preservan la calidad del ovocito (Wang et al., 1994). Lo que queda por dilucidar es si las distintas observaciones entre los grupos de investigación se deben a las condiciones experimentales, al tipo de semen empleado o a otros factores. En este sentido, Campos et al. (2001) mostraron que la presencia del cúmulus, y no el estadio maduracional del ovocito, es principalmente el responsable de las diferencias observadas en la penetrabilidad *in vitro* de los ovocitos maduros frente a los inmaduros.

Debido a que en estos trabajos sobre el efecto del cúmulus durante la FIV no se ha continuado el desarrollo embrionario, se carecen de los datos comparados sobre la viabilidad de los ovocitos fecundados bajo estas condiciones. Sin embargo, sí existen estudios interesantes sobre el efecto del cúmulus durante la MIV en la posterior viabilidad embrionaria. Chian et al. (1994) investigaron el efecto del cúmulus durante la MIV de ovocitos bovinos observando que aunque el desarrollo a estadio de 2-8 células a las 48 horas postfecundación no se veía afectado, las proporciones de embriones que se desarrollaban a estadio de 8-32 células, mórula y blastocisto fueron significativamente menores en los ovocitos madurados en ausencia del cúmulus. También se ha indicado que los ovocitos de oveja madurados sin cúmulus fallan en la división embrionaria tras la FIV (Crosby et al., 1981). En su estudio sobre el desarrollo embrionario de cigotos rodeados o no por su cúmulus, Carolan et al. (1995) no encontraron efectos significativos de estas células sobre ninguno de los parámetros de desarrollo embrionario.

También se han llevado a cabo estudios sobre el efecto de las células del *cumulus oophorus* durante la MIV sobre la ZP, pero no se dispone de datos durante la FIV. Aunque se ha propuesto que la MIV de ovocitos rodeados por su cúmulus reduce el grado de endurecimiento de la ZP que ocurre de forma espontánea durante el cultivo de ovocitos de ratón (De Felici y Siracusa, 1982), Chian et al. (1994) no hallaron diferencias significativas entre ovocitos madurados con y sin cúmulus en lo que se refiere al endurecimiento de la ZP, aunque estos mismos autores proponen que el efecto del cúmulus durante la MIV entre ovocitos bovinos y de otras especies puede ser diferente.

Al revisar los estudios del efecto del cúmulus sobre los GC encontramos nuevamente que éstos se han llevado a cabo durante la MIV pero no en los momentos que rodean a la FIV, a pesar de que es en este momento en el que se produciría la reacción cortical. El completo estudio de Galeati et al. (1991) observando el efecto de la denudación a distintos tiempos de MIV ayudó a una mejor comprensión de la función de los GC, concluyendo que la persistencia de la interacción entre el cúmulus y el ovocito estabiliza la distribución de los GC, que la interrupción de esta unión induce la exocitosis de los gránulos y demostrando que las células del cúmulus durante la MIV son fundamentales para que el ovocito porcino mantenga su penetrabilidad. Además, en este trabajo los autores observaron que la manipulación de los ovocitos antes de denudarlos provoca una exocitosis prematura de los GC que podría explicar la disminuida penetrabilidad de los ovocitos maduros denudados.

Así pues, las células del cúmulus son indispensables durante la maduración del ovocito para lograr un correcto desarrollo citoplasmático y durante la fecundación, al menos, para mantener una elevada penetrabilidad aunque carecemos de estudios posteriores sobre desarrollo embrionario temprano.

2.2.2.4 Células oviductales

El oviducto es un tubo muscular con una capa serosa y una mucosa que normalmente se divide en cuatro regiones: infundíbulo (bordeado por fimbrias y abierto por el *ostium* tubárico hacia la cavidad peritoneal), ampolla, istmo y unión utero-tubárica. En la mayor parte de su longitud posee dos capas musculares, una externa longitudinal y una interna circular, mientras que la mucosa se dispone en pliegues. Las proporciones de músculo y mucosa varían a lo largo del oviducto. En los mamíferos, el oviducto proporciona el microambiente adecuado para importantes procesos reproductivos como el transporte de los gametos, la fecundación y el desarrollo

embrionario temprano. Este microambiente se consigue gracias a la propia superficie celular del oviducto y al fluido oviductal al que hemos hecho referencia anteriormente.

En cuanto a la capa epitelial, se trata de epitelio pseudoestratificado columnar intermitentemente ciliado (Banks, 1981). Así las células que revisten el borde del lumen del oviducto son de dos tipos: ciliadas (con numerosos cilios y microvellosidades) y no ciliadas (o secretoras) con alguna célula linfoide dispersa (Walter, 1995). Las fimbrias y el infundíbulo son abundantemente ciliados y la proporción de células ciliadas disminuye aumentando la de las secretoras en dirección hacia el istmo, donde estas últimas se convierten en más numerosas (Hafez, 1972; Leese, 1983). El concepto de que las células secretoras están relacionadas con la síntesis de todos los componentes del FO es demasiado simplista ya que la capa epitelial del oviducto debería ser considerada en su totalidad. Aunque tradicionalmente no se ha pensado que las células ciliadas estén involucradas en la formación del FO, este aspecto podría necesitar una revisión.

Existe la convicción general de que las células secretoras sufren un ciclo de hipertrofia y atrofia a lo largo del ciclo estral. En el oviducto de coneja, que es quizás el mejor caracterizado al respecto, la altura del epitelio ciliar y la actividad secretora aumentan durante la dominancia de estrógenos, y ocurre una liberación de gránulos secretores después del coito (Leese, 1988). Sin embargo, existen diferencias entre especies tanto en la duración de estos cambios como en el tipo de gránulos y la naturaleza de los procesos secretores (Rüsse y Leibich, 1979). Existen trabajos contradictorios sobre los cambios cíclicos en las células ciliadas, atribuibles a diferencias entre especies, dentro de los oviductos de la misma especie y dentro de oviductos de un mismo animal. Aún así, parece claro que los cambios cíclicos en las células ciliadas no son tan importantes como los observados en las no ciliadas (Verhage et al., 1979).

Las células oviductales pueden utilizarse tanto para investigar las interacciones espermatozoides-oviducto, como para recrear las condiciones apropiadas para una correcta fecundación aproximando el proceso de fecundación a las condiciones *in vivo*. Concretamente los cultivos de células epiteliales del oviducto porcino (POEC) se han empleado *in vitro* tanto antes como durante la FIV (Kano et al., 1994; Dubuc y Sirard, 1995; Romar et al., 2001) y bajo distintas condiciones: vesículas en suspensión (Dubuc y Sirard, 1996; Park y Sirard, 1996), monocapas (Nagai y Moor, 1990; Kano et al., 1994; Gadea et al., 1998). Igualmente se han utilizado células procedentes de distintas regiones del oviducto (Suarez et al., 1991; Dubuc y Sirard, 1996; Fazeli et al., 1999), de diferentes estadios del ciclo reproductivo (Techakumphu y Srianan, 1994;

Vatzias y Hagen, 1999) e incluso se han condicionado medios de cultivo con POEC (Kano et al., 1994; Vatzias y Hagen, 1999).

Básicamente el método de obtención de las células es a partir de oviductos de matadero con un posterior aislamiento en el laboratorio por técnicas mecánicas o enzimáticas. La viabilidad de las POEC tras su obtención se comprueba mediante tinciones vitales como el tripán azul y la observación a nivel microscópico del movimiento ciliar (Gabler et al., 1997). Ya que la obtención de un grupo celular heterogéneo deja lugar a dudas sobre el tipo celular aislado, la verificación de que el tipo celular aislado se corresponde con células epiteliales verdaderas se puede realizar con citoqueratinas, marcadores epiteliales específicos que tiñen los filamentos de queratina (Thibodeaux et al., 1992; Reischl et al., 1999). Además, con técnicas de microscopía electrónica y de inmunocitoquímica se ha mostrado que las células epiteliales mantienen su actividad secretora en cultivo (Ouhibi et al., 1991) y que liberan factores embriotrópicos, tanto *in vivo* como *in vitro*, implicados en la cronología y regulación del desarrollo embrionario (Rizzino, 1987).

En un cultivo primario, las células se adhieren al soporte utilizado aproximadamente en 2-3 días perdiendo su forma cuboide y apareciendo en forma de huso alargado (Ouhibi et al., 1991). En unos 5-8 días (dependiendo del área a tapizar) se consigue una monocapa de células poligonales cohesivas pudiendo aparecer asociadas a éstas, células policariotas y fibroblastos dependiendo de la pureza del cultivo (Ouhibi et al., 1989). En los cultivos en monocapa se manifiesta la inhibición por contacto y hay que reseñar que las células epiteliales no crecen en ausencia de suero. Tras el primer subcultivo o pase, las células ciliadas tienden a desaparecer (Ouhibi et al., 1989) observándose, tras varios pases, una alteración espontánea en la morfología y crecimiento dependiendo de la especie.

En la especie porcina, los estudios *in vitro* han mostrado que las POEC tienen un efecto beneficioso sobre la fecundación de ovocitos inmaduros (Romar et al., 2001) o madurados *in vitro* (Nagai y Moor, 1990; Kano et al., 1994; Dubuc y Sirard, 1995) fecundados con semen refrigerado. Nagai y Moor (1990) sugirieron que el efecto favorecedor de la monospermia se debía a la presencia de glicoproteínas en el medio secretadas por las células oviductales y resumieron a tres niveles el efecto de las células sobre los gametos: 1º) interacción de las secreciones oviductales con las envolturas del cigoto, ya que al menos dos proteínas oviductales se unen a la ZP del cigoto porcino aunque no parece que modulen la penetración; 2º) una interacción de las proteínas secretadas (glicoproteínas) y los espermatozoides fecundantes aunque la interrelación espermatozoides-oviducto no induce una penetración o formación de

PNM más rápida de la que se observa en ausencia de células; 3º) un efecto beneficioso general no específico sobre el medio de cultivo usado durante las fases de cocultivo de los gametos y fecundación.

Aunque los primeros sistemas para el cultivo *in vitro* de embriones (CE) se basaron en intentos de imitar el ambiente oviductal con células epiteliales del oviducto en cocultivo (Gandolfi et al., 1989), el posible efecto sobre los embriones cuando las células están presentes durante la FIV se desconoce ya que los trabajos que han estudiado su repercusión durante la FIV no se han continuado hasta los primeros estadios embrionarios.

Uno de los factores a tener en cuenta al utilizar estos cultivos celulares en el laboratorio es el tipo de espermatozoides empleados y la concentración espermática. Se ha observado que con espermatozoides eyaculados crioconservados el efecto favorecedor de las células oviductales sobre la penetración se mantiene, pero existe un efecto contradictorio sobre la polispermia (Gadea et al., 1998; Romar et al., 2001). Se desconoce si empleando espermatozoides de epidídimo descongelados su comportamiento sería similar al de los eyaculados. Además, el efecto favorecedor sobre la monospermia se mantiene únicamente entre unos rangos de concentración espermática adecuados aunque los porcentajes de penetración no se vean modificados (Dubuc y Sirard 1994; Romar et al., 2001).

Así como el FO se ha empleado como un suplemento para la FIV, también se han condicionado medios de cultivo con células oviductales para su posterior uso en FIV o CE. Los tiempos para el condicionamiento de los medios varían según los autores: 6 horas (Kano et al., 1994) ó 72 horas (Chian y Sirard, 1995), observándose en porcino que este medio disminuye la polispermia, efecto que no se observa cuando el medio es condicionado por fibroblastos (Kano et al., 1994). Los resultados obtenidos con el condicionamiento del medio serían consistentes con la visión de que las células, por un lado, alterarían la composición del medio secretando factores embriotróficos (Gandolfi et al., 1989) y por otro tendrían un efecto detoxificante sobre el mismo eliminando sustancias tóxicas (Bavister, 1988), lo que favorecería el desarrollo embrionario.

En cuanto al efecto que podrían ejercer las células oviductales y/o sus secreciones sobre la ZP, Broermann et al. (1989) observaron que tanto los ovocitos porcinos madurados *in vivo* como los embriones, son más resistentes a la digestión con una solución proteolítica, a base de tripsina y pronasa, que los ovocitos procedentes del folículo ovárico. Estos mismos autores mostraron que las secreciones

oviductales endurecen la ZP colocando ovocitos foliculares en el interior de los oviductos durante 30 minutos y observando que la ZP se hacía más resistente a la digestión con proteasas que la de los ovocitos no expuestos. Posteriormente, Buhi et al. (1993) detectaron proteínas secretadas por el oviducto en la ZP, espacio perivitelino y membrana plasmática de ovocitos oviductales y embriones. Con el tiempo, otros autores han observado este mismo efecto de endurecimiento de la ZP de ovocitos cultivados con medio conteniendo FO (Kim et al., 1996) pero carecemos de datos del tiempo de digestión de la ZP en ovocitos cultivados en contacto con monocapas de células oviductales.

Kim et al. (1996) apuntaron que algún(os) factor(es) de las secreciones oviductales era necesario para una reacción cortical completa en ovocitos porcinos madurados *in vitro* apoyando la hipótesis de que es la deposición de una(s) glicoproteína(s) en la ZP, seguida de su entrada al espacio perivitelino, la que facilitaría o bien una exocitosis más sincrónica de los GC o bien un aumento de la reacción de la ZP al contenido de los GC. Las hipótesis en este campo siguen en debate desde que Wang et al. (1998) indicaran que los ovocitos porcinos madurados *in vivo* e *in vitro* poseen la misma capacidad de liberar el contenido de los GC.

Las monocapas de POEC *in vitro* no sólo unen los espermatozoides, sino que también mantienen su viabilidad y su capacidad fecundante (Pollard et al., 1991). El tiempo de adhesión de los espermatozoides a las células es de unos 20 minutos y los espermatozoides cocultivados con células mantienen el movimiento flagelar y su motilidad durante 6 horas de cocultivo a diferencia de los no preincubados con POEC (Nagai y Moor, 1990). Roh et al. (1998) apuntaron que tanto para la unión espermática como para el mantenimiento de la motilidad, las células del istmo juegan un papel más importante que las de la ampolla. Sin embargo, Chian y Sirard (1995) observaron que la unión de los espermatozoides de toro a las células epiteliales de la ampolla mejoraba la capacitación espermática, pero que tanto las células de la ampolla como las del istmo actúan sinérgicamente para inducir una capacitación eficiente, proceso que se inicia tanto por la unión a la monocapa de células oviductales como por la exposición al medio condicionado por las mismas.

En porcino, Rodríguez-Martínez et al. (1998) observaron que, independientemente de que el cultivo sea procedente de istmo o ampolla, el 65% de los espermatozoides se unen a las células oviductales en 2 horas pero sólo los cocultivados con células del istmo mantienen su unión hasta pasadas 5 horas. Según Dubuc y Sirard (1994) las células oviductales podrían tener un efecto sobre la selección de los espermatozoides resultando en una reducción de la polispermia y

para Kano et al. (1994) serían algún(os) factor(es) solubles derivados a partir de las células epiteliales los que disminuirían el número de espermatozoides que penetran el ovocito sin modificar el porcentaje de fecundación.

Uno de los campos que quedaría abierto a nuevos estudios es el de la(s) posible(s) interacción(es) entre las células del *cumulus oophorus* y las del oviducto cuando se emplean *in vitro* ovocitos no desnudados.

2.3 OTROS ESTUDIOS: INTERACCIONES CÉLULAS-MOLÉCULAS

Aparte de los estudios que se llevan cabo a nivel bioquímico y celular existen una serie de trabajos, profundizando en las interacciones *in vitro* de los gametos con ciertas moléculas, que están abriendo nuevas líneas de investigación. Hemos visto que el medio ambiente que ocupa el lumen oviductal es complejo y sería imprudente asumir que ninguno de sus componentes es redundante. Sin embargo, tal y como apunta Leese (1988) las moléculas que parecen encajar más claramente en el papel de “factores ausentes” *in vitro* son las glicoproteínas derivadas del oviducto. Quizá por ello se han realizado estudios buscando esa posible interacción en el laboratorio y básicamente estos trabajos consisten en el cultivo de los gametos con explantes oviductales, FO e incluso con glicoproteínas oviductales purificadas.

2.3.1 Interacciones *in vivo*

El oviducto, mediante secreciones controladas hormonalmente, proporciona un ambiente bioquímico que facilita, o podría ser esencial *in vivo*, para distintos procesos como la capacitación espermática, la fecundación o la división embrionaria en estadios tempranos. Como se detalló en el apartado 2.2.1.1, parte de las proteínas y otras macromoléculas del FO no provienen del trasudado del suero sanguíneo sino que son sintetizadas y secretadas por el epitelio oviductal. Tras la ovulación, la composición de la ZP del ovocito se modifica por la adición de estas glicoproteínas oviductales, llamadas “oviductinas” (Robitalle et al., 1988), algunas de las cuales son específicas de las distintas fases del ciclo estral (Buhi et al., 1989).

Estas oviductinas han sido detectadas sobre la ZP de ovocitos de numerosas especies. Hedrick et al. (1987) pudieron observar en ovocitos porcinos que el oviducto modificaba la ZP concretamente mediante la adhesión de tres componentes con un peso molecular de 82, 102 y 210 Kd respectivamente. Más recientemente, Buhi et al.

(1993) identificaron y caracterizaron tres glicoproteínas de alto peso molecular, estrógeno-dependientes que fueron detectadas dentro de la ZP, el espacio perivitelino y la membrana plasmática de los ovocitos porcinos.

Lógicamente la adhesión a la ZP de estas oviductinas podría modificar los receptores espermáticos en la zona. En muchas especies de mamíferos, después de entrar en el oviducto, los espermatozoides son almacenados en la parte del istmo gracias a la unión a las células que bordean el epitelio. En el cerdo, este contacto espermatozoide-célula oviductal constituye una fase final de maduración confiriendo al gameto masculino la capacidad de atravesar las distintas cubiertas del gameto femenino (Hunter, 1984).

De estas observaciones parten una serie de trabajos *in vitro* buscando esas interacciones entre los gametos y los factores oviductales.

2.3.2 Interacciones *in vitro*

Como hemos relatado a lo largo de la revisión, los cultivos de células oviductales se han empleado recientemente con el fin de imitar o aproximar las condiciones que los gametos encuentran *in vivo* y conseguir estas interacciones. Los primeros en utilizar los cultivos oviductales para precultivar espermatozoides de verraco fueron Nagai y Moor (1990) quienes observaron que la fecundación en presencia de monocapas de POEC no reducía la polispermia. Sin embargo, al precultivar los espermatozoides durante 2'5 ó 3'5 horas sí se reducía el porcentaje de ovocitos polispermicos. A raíz de sus observaciones, estos autores ya apuntaron que el posible efecto *in vitro* de las células sobre los gametos se debía a una interacción de las secreciones oviductales con las envolturas del cigoto, a una interacción de las glicoproteínas secretadas y los espermatozoides fecundantes o bien a un efecto beneficioso general no específico sobre el medio de cultivo usado durante las fases de cocultivo y fecundación.

Con el paso del tiempo, otros autores han decidido utilizar directamente para sus estudios muestras de FO, asegurándose así el aporte glicoproteico. Así pues, Kim et al. (1996) cultivaron ovocitos porcinos durante 1'5 horas en un medio suplementado con 10 ó 30% de FO antes de la FIV y consiguieron incrementar la incidencia de monospermia sin disminuir la penetración. Este mismo equipo corroboró estos buenos resultados en un trabajo posterior preincubando los espermatozoides para la FIV durante 1'5 ó 3 horas en FO observando que disminuía el número medio de

espermatozoides por ovocito (Kim et al., 1997). En ambos casos se sugirió, nuevamente, que este efecto beneficioso se debería a ciertas glicoproteínas en las secreciones del FO que reducirían la fecundación polispérmica y el número de espermatozoides que penetraran el ovocito.

De este modo, ante las especulaciones de que fueran las glicoproteínas las causantes de la mejora en los resultados, Martus et al. (1998) decidieron purificarlas directamente en el laboratorio. Así, aislaron una proteína, de peso molecular menor a 50 Kd, a partir de oviductos de vacas en distintos estadios del ciclo. Al preincubar los espermatozoides y realizar la FIV en un medio de cultivo suplementado con esta glicoproteína oviductal encontraron mejoras en la fecundación. De este modo propusieron la inclusión de las glicoproteínas en los protocolos de FIV para reducir las concentraciones espermáticas a utilizar manteniendo porcentajes de fecundación aceptables.

Muy recientemente Kouba et al. (2000), siguiendo este camino, observaron que la exposición de los ovocitos porcinos madurados *in vitro* desnudos, 4 horas antes de la FIV y durante la misma, a glicoproteínas oviductales purificadas reduce la polispermia, el número de espermatozoides adheridos a la ZP e incrementa los porcentajes de división embrionaria. Estos resultados podrían confirmarse ya que es posible mejorar las penetraciones monospérmicas en la especie porcina cocultivando los ovocitos en monocapas de POEC durante 4 horas antes de la FIV y con un tiempo de contacto entre gametos de 6 horas (Romar et al., 2001).

Evidentemente, son necesarios estudios más profundos en el campo de las interacciones entre los factores oviductales y los gametos pero, de confirmarse los escasos resultados que existen hasta la fecha, en un futuro las glicoproteínas oviductales purificadas podrían convertirse en un de los suplementos habituales de los medios para FIV.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

En este apartado describiremos la metodología seguida en el presente trabajo refiriendo simultáneamente el material utilizado. Salvo que se indique lo contrario todos los reactivos empleados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Madrid, España; Taufkirchen, Alemania).

3.1 MEDIOS DE CULTIVO Y SUPLEMENTOS

Los medios para el cultivo de células epiteliales de oviducto porcino (POEC), maduración *in vitro* de ovocitos (MIV), fecundación *in vitro* (FIV) y cultivo *in vitro* de embriones (CE) se detallan a continuación:

- Medio **TCM-199** con sales de Earle, L-glutamina y bicarbonato sódico. A partir de 100 ml de medio stock comercial se preparó el medio para el cultivo de las células POEC suplementado con 13% (v/v) de suero fetal bovino (Biological Industries, Beitz Haemek, Israel), 150 UI/ml de penicilina G sódica y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina (Gibco BRL, Paisley, Reino Unido) tal y como describen Ouhibi et al. (1991). El medio suplementado se conservó en condiciones estériles a 4°C durante el periodo máximo de un mes.

- Medio **NCSU-37**. Se preparó en el laboratorio una solución stock (Tabla 2) con agua ultrapura (Milli-Q). A continuación se esterilizó por filtración haciéndolo pasar a través de un filtro de membrana con diámetro de 0'22 µm y se conservó en condiciones estériles a 4°C durante un máximo de dos semanas.

Para MIV, el medio NCSU-37 stock se suplementó con cisteína, β-mercaptoetanol, insulina, glutamina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), dibutil AMP cíclico (dbAMPc), fluido folicular porcino (PFF), PMSG y HCG (Foligón, Chorulón; Intervet International B.V., Boxmeer, Holanda) tal y como describen Funahashi et al. (1997) y como se refleja en la tabla 3.

Tabla 2. Composición del medio NCSU-37 stock (Peters y Wells, 1993).

Componente	Concentración (mM)
NaCl	108'73
NaHCO ₃	25'07
KCl	4'78
KH ₂ PO ₄	1'19
MgSO ₄ •7H ₂ O	1'19
CaCl ₂ •2H ₂ O	1'70
Glucosa	5'55
D-Sorbitol	12'00
Penicilina G sódica	0'18
Sulfato de estreptomicina	39'00 U/ml

Tabla 3. Suplementos del medio NCSU-37 para maduración *in vitro* de ovocitos porcinos (Funahashi et al., 1997).

Componente	Concentración
Cisteína	0'57 mM
β-mercaptoetanol	50'00 μM
Insulina	5'00 mg/L
Glutamina	1'00 mM
EGF	10'00 ng/ml
dbAMPc	1'00 mM
PFF	10% (v/v)
PMSG	10 UI/ml
HCG	10 UI/ml

- Medio **TALP**. La solución stock (Tabla 4) se preparó en el laboratorio con agua ultrapura tal y como describen Rath et al. (1999). Se esterilizó por filtración y se conservó bajo condiciones estériles a 4°C durante un máximo de cuatro semanas.

Tabla 4. Composición del medio TALP stock (Rath et al., 1999).

Componente	Concentración (mM)
NaCl	114'06
NaHCO ₃	25'07
KCl	3'20
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	0'35
MgCl ₂ •6H ₂ O	0'50
Lactato Ca•5H ₂ O	8'00
Lactato sódico	10'00
Glucosa	5'00
Cafeína	2'00
Sulfato de kanamicina	0'17
Rojo fenol	0'003
PVA	1 mg/ml

Para FIV, el medio TALP stock se suplementó con 3 mg/ml de albúmina sérica bovina y 0'12 mg/ml de piruvato sódico, tal y como describen Rath et al. (1999) y el pH se ajustó hasta 7'4 en un incubador al 5% de CO₂, 38'5°C y atmósfera saturada de humedad.

- **Medio NCSU-23.** Siguiendo el protocolo de Peters y Wells (1993), se preparó una solución stock (Tabla 5) con agua ultrapura, se esterilizó por filtración y se conservó a 4°C durante un máximo de dos semanas. En el momento de su uso para CE, el NCSU-23 stock se suplementó con 4 mg/ml de albúmina sérica bovina y 1 mM de glutamina.

Mientras no se especifique lo contrario, cuando se haga referencia a un medio de cultivo se entenderá como finalmente suplementado para cultivo de células POEC, MIV, FIV o CE.

Tabla 5. Composición del medio NCSU-23 stock (Peters y Wells, 1993).

Componente	Concentración (mM)
NaCl	108'73
NaHCO₃	25'07
KCl	4'78
KH₂PO₄	1'19
MgSO₄•7H₂O	1'19
CaCl₂•2H₂O	1'70
Glucosa	5'55
Taurina	7'00
Hipotaurina	5'00
Penicilina G sódica	0'18
Sulfato de estreptomina	39 U/ml

3.2 CULTIVO DE CÉLULAS EPITELIALES DE OVIDUCTO PORCINO (POEC)

Los oviductos se obtuvieron a partir de genitales de cerdas prepúberes híbridas comerciales, aproximadamente de 90-100 kg de peso, sacrificadas en matadero y transportados al laboratorio en un recipiente atemperado a 38-39°C en el plazo máximo de 3 horas desde el sacrificio. A su llegada se realizaron dos lavados en un tampón fosfato salino de Dulbecco modificado (PBS), atemperado y sobre una placa de Petri con PBS se procedió a la disección del oviducto completo separándolo de los tejidos adyacentes y el ovario.

El procedimiento de obtención de las células epiteliales del oviducto fue básicamente el descrito por Ouhibi et al. (1991) y consistió en hacer pasar por el interior de la luz oviductal una solución comercial de tripsina porcina específica para cultivo de células endoteliales (500 BAAE unidades de tripsina porcina y 180 µg de EDTA en PBS). Seguidamente se oprimió uno de los extremos del oviducto, se llenó la luz oviductal con la solución enzimática y se cerró el otro extremo dejando actuar la tripsina por un periodo de 45 minutos a 38'5°C. Pasado este tiempo se cortaron los puntos de contención y se exteriorizó el contenido oviductal por presión mecánica con una pinzas sobre las paredes del oviducto. El contenido se recogió sobre una placa de Petri con medio 199 equilibrado en el incubador de CO₂ al menos 2 horas y las células oviductales se disgregaron mediante aspiración con una pipeta automática. A continuación se centrifugó a 800 g durante 4 minutos descartándose el sobrenadante y

diluyendo el *pellet* con medio 199 fresco. Tras una segunda centrifugación a 800 g durante 4 minutos, el sedimento se resuspendió con medio 199 fresco y se ajustó la concentración celular mediante recuento en cámara hemocitométrica. Las células se sembraron a una concentración aproximada de 1×10^6 células/ml de medio en las respectivas placas de Petri con medio 199 equilibrado previamente al menos 2 horas.

Pasados 3 días desde la siembra, el medio con las células no adheridas fue reemplazado por medio 199 fresco comprobándose la adhesión de las células a la superficie de la placa. Este proceso se repitió cada 2 días hasta la total confluencia de las células en una monocapa tras 7-9 días de la siembra. En cada cambio de medio se comprobó la ausencia de contaminación, el crecimiento celular y el movimiento ciliar en los cultivos. Todos los cultivos de células oviductales empleados en este trabajo fueron de tipo primario.

3.3 PRUEBAS DE INMUNOCITOQUÍMICA

Para establecer la naturaleza epitelial en los cultivos celulares a emplear en los experimentos, se realizaron pruebas de inmunocitoquímica indirecta utilizando anticuerpos contra la citoqueratina (Thibodeaux et al., 1992; Walter, 1995; Reischl et al., 1999). El procesado de las células epiteliales fue similar al descrito en el apartado anterior pero en este caso se introdujo un cubreobjetos estéril en cada placa de Petri. Pasados 3 ó 4 días de la siembra, y tras comprobar la adhesión y crecimiento de las células, las muestras se procesaron para los ensayos siguiendo el protocolo descrito por Cox y Leese (1997) con ligeras modificaciones.

Los cubreobjetos se lavaron tres veces en PBS antes de fijarlos en una solución de metanol:acetona (7:3 v/v) durante 7 minutos. A continuación se añadieron sobre una de las muestras 50 μ l de anticuerpo monoclonal anticitoqueratina 8.13 (Walter, 1995) a una dilución 1:20 (v/v) en PBS con 0'5% de Tritón X-100 con el fin de marcar aquellas células que fuesen verdaderamente epiteliales. Sobre otro cubreobjetos, procedente del mismo cultivo celular, se añadieron 50 μ l de anticuerpo antitubulina E7 a una dilución 1:100 (v/v) en PBS con 0'5% de Triton X-100 con el objeto de visualizar el citoesqueleto celular. Finalmente sobre otro cubreobjetos se añadieron 50 μ l de PBS con 0'5% de Tritón X-100 sin ningún anticuerpo para utilizarlo como testigo blanco de la técnica. Todas las muestras se incubaron durante 1 hora a 37°C en una atmósfera saturada de humedad.

Pasado este tiempo, las muestras se lavaron 3 veces con PBS y posteriormente se añadieron sobre cada cubreobjetos 500 µl de un segundo anticuerpo conjugado con 5 mM de fluorocromo azida (*antimouse* Alexa; Molecular Probes, Leiden, Holanda) a una dilución 1:2000 (v/v) en PBS con 0'5% de Tritón X-100. Las muestras se incubaron nuevamente durante 1 hora a 37°C y atmósfera saturada de humedad lavándose posteriormente 3 veces en PBS. Seguidamente se añadieron sobre cada cubreobjetos 100 µl de colorante Hoescht 33342 a una dilución 1:100 (v/v) en metanol puro con el fin de teñir los núcleos celulares y se mantuvo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron las muestras con metanol puro y se montaron sobre portaobjetos haciendo contactar las células con el mismo.

Este proceso se repitió del mismo modo con muestras celulares procedentes de fibroblastos fetales porcinos que se utilizaron como control negativo de la técnica (Reisch et al., 1999).

3.3.1 Valoración microscópica de resultados

Todas las muestras se visualizaron en un microscopio de contraste de fases con fluorescencia (Nikon) a 400 aumentos y se excitaron con una longitud de onda de 495 nm. Se consideraron células oviductales epiteliales aquellas que tras la tinción con la anticitoqueratina mostraron el citoplasma celular teñido de verde y células no epiteliales aquéllas que, al igual que los fibroblastos, no emitieron fluorescencia. Los núcleos celulares tras la tinción con Hoescht se mostraron de color azul y el citoplasma de las muestras celulares teñidas con antitubulina se observó de color verde.

3.4 OBTENCIÓN DE OVOCITOS Y MADURACIÓN *IN VITRO* (MIV)

Los ovarios se obtuvieron en el matadero a partir de cerdas prepúberes y se transportaron al laboratorio en un recipiente atemperado a 39°C en un plazo máximo de 3 horas desde el sacrificio de los animales.

Una vez en el laboratorio, los ovarios se sometieron a dos lavados en PBS atemperado y los ovocitos se obtuvieron, mediante aspiración con bomba de vacío, de los folículos ováricos con un diámetro entre 3-6 mm. El contenido folicular se recogió en tubos estériles y se resuspendió en PBS atemperado dejándolo sedimentar durante

5 minutos. Pasado este tiempo se repitió la misma operación y el *pellet* se diluyó con PBS fresco. Bajo el estereomicroscopio (Nikon) y a 20 aumentos, se seleccionaron aquellos ovocitos con un citoplasma homogéneo y granuloso y rodeados por varias capas de células del *cumulus oophorus* con un aspecto compacto. Los complejos células del *cumulus oophorus*-ovocito (COCs) se aspiraron con una pipeta Pasteur adelgazada con el extremo romo y conectada a un tubo flexible de silicona.

Los COCs seleccionados se lavaron una vez en PBS atemperado y dos veces en medio NCSU-37 previamente equilibrado a 38'5°C en el incubador a 5% de CO₂ y atmósfera saturada de humedad (Heraeus) durante al menos tres horas. El cultivo se llevó a cabo en grupos de 45-50 COCs en un volumen de medio de 500 µl. Pasadas 20-22 horas de cultivo, los COCs fueron transferidos a medio NCSU-37 libre de PMSG, HCG y dbAMPc donde se lavaron 2 veces y se cultivaron durante 20-22 horas (Funahashi y Day, 1993b).

3.5 OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES Y FECUNDACIÓN *IN VITRO*

El semen utilizado procedió de un único verraco (cruce de Large White y Landrace) perteneciente al Instituto de Ciencia y Comportamiento Animal (Mariensee, Alemania) que estaba siendo utilizado en programas de inseminación artificial con buenos resultados.

Inmediatamente tras el sacrificio del verraco, a los dos años de edad, los testículos se transportaron en un termo al laboratorio donde se aisló el epidídimo completo por disección (Rath y Niemann, 1997). A continuación se procedió al lavado del conducto deferente en dirección caudal con diluyente Androhep® (Minitüb, Tiefenbach, Alemania) recogiendo el medio en un recipiente estéril. El semen se sometió a una centrifugación a 800g durante 10 minutos y el *pellet* de espermatozoides se sometió a crioconservación siguiendo la técnica descrita por Westendorf et al. (1975) en pajuelas de 0'25 ml a una concentración de 5x10⁷ espermatozoides por pajueta (Rath y Niemann, 1997).

Para la fecundación *in vitro* se descongelaron 3 pajuelas a 38°C durante 20 segundos (Rath y Niemann, 1997), se valoró la motilidad espermática en una escala subjetiva de 0 a 100 y la calidad de movimiento en una escala subjetiva de 0 a 5. A continuación, el semen se resuspendió en 10 ml de Androhep® atemperado a 39°C y se centrifugó a 800g durante 3 minutos para eliminar las partículas groseras y restos de los crioprotectores. El sedimento se resuspendió con medio TALP preequilibrado

dos horas a 38'5°C y 5% de CO₂ y, mediante un recuento en una cámara hemocitométrica, se ajustó la concentración espermática final a un *ratio* de 1500 espermatozoides/ovocito en un volumen de inseminación de 10 µl para todas las experiencias. Previamente a la fecundación *in vitro* se valoraron nuevamente la motilidad espermática y la calidad de movimiento empleándose únicamente las muestras con motilidad nunca menor al 70 y calidad de movimiento no inferior a 3.

Para la FIV se equilibraron en el incubador de CO₂ las placas de Petri correspondientes con 90 µl de medio TALP bajo aceite de parafina (Experiencia 2.1) o 190 µl de medio TALP (Experiencias 2.2, 3.2 y 4.2). En todos los casos se dispusieron 45-50 ovocitos madurados *in vitro* previamente lavados 2 veces con medio TALP. Aproximadamente 30 minutos más tarde se depositaron en cada placa 10 µl de la solución espermática.

Los gametos se coincubaron durante 18-20 horas en condiciones de 38'5°C de temperatura y 5% de CO₂ en aire saturado de humedad. Pasado este periodo de tiempo se valoraron los resultados de la fecundación *in vitro*.

3.5.1 Valoración microscópica de resultados

Tras el periodo de coincubación se eliminaron de forma mecánica los restos de células del *cumulus oophorus* y los espermatozoides adheridos a la superficie del ovocito en PBS atemperado. Los ovocitos se fijaron siguiendo la técnica descrita por Chang (1952) con ligeras modificaciones (Coy, 1991). Los ovocitos permanecieron en una solución fijadora de etanol absoluto:ácido acético (3:1 v/v) durante 24 horas tras las cuales se tiñeron con colorante lacmoid al 1%.

Tras la tinción, las preparaciones se visualizaron a 200-400 aumentos en microscopio de contraste de fases (Nikon). Los ovocitos no maduros a nivel nuclear (en estadio de vesícula germinal u otros previos a metafase II; Figuras 2.1 y 2.2), así como los degenerados, partenogenéticos o no visualizables por la técnica de tinción quedaron registrados, aunque fueron descartados en el estudio estadístico. Se consideraron ovocitos no penetrados aquellos en estadio nuclear de metafase II (placa metafásica y primer corpúsculo polar; Figura 2.3) o con un pronúcleo femenino sin cabezas ni colas espermáticas en el interior del citoplasma. Se contabilizaron como ovocitos penetrados aquellos con, al menos, un espermatozoide en su interior ya fuera con la cabeza en forma compacta, descondensada o de pronúcleo masculino. Como ovocitos capaces de formar pronúcleo masculino se incluyeron aquellos con al menos

un pronúcleo masculino y otro femenino (Figuras 2.4 y 2.5). Para contabilizar el número de espermatozoides por ovocito se tuvieron en cuenta los pronúcleos masculinos al igual que las cabezas espermáticas en descondensación y compactas (Figura 2.6). Se consideraron ovocitos monospermicos aquellos con un único espermatozoide en su interior en cualquiera de sus formas. Los espermatozoides adheridos a la superficie del ovocito se diferencian de los que están en el interior del mismo por las características de tinción y el plano óptico donde se encuentran.

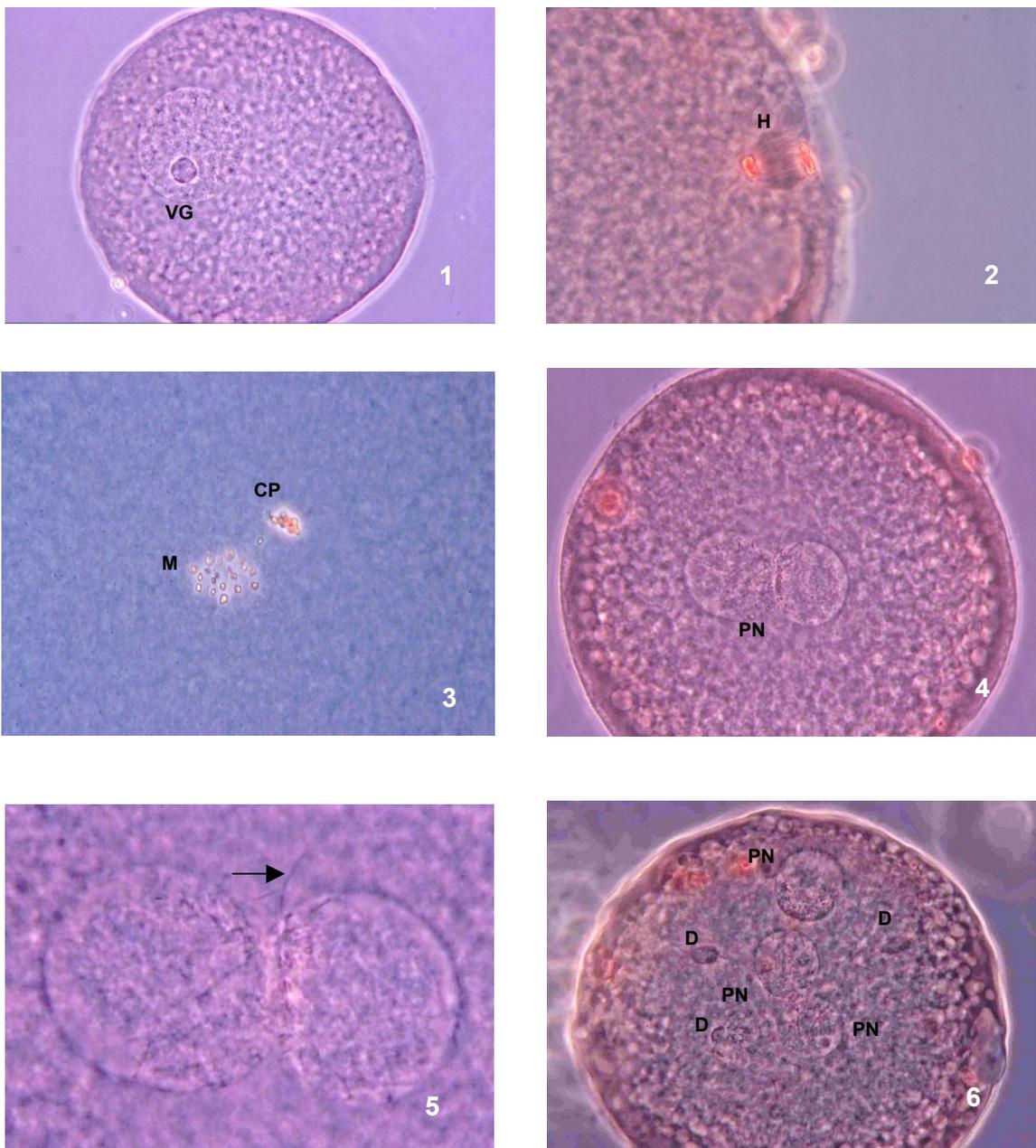
Las variables estudiadas tras la FIV fueron las siguientes:

- Porcentaje de ovocitos penetrados (% **Penetración**): se calculó como el número de ovocitos penetrados sobre el total de ovocitos maduros.
- Número medio de espermatozoides por ovocito (**E/O**): se valoró como el número medio de espermatozoides por ovocito penetrado.
- Porcentaje de formación de pronúcleo masculino (% **PNM**): número de ovocitos que presentaron al menos un pronúcleo masculino sobre el total de ovocitos penetrados.
- Porcentaje de monospermia (% **Monospermia**): número de ovocitos monospermicos en relación al número total de ovocitos penetrados.

3.6 CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIONES (CE)

A las 18-20 horas de la fecundación *in vitro*, los cigotos se trasladaron a medio NCSU-23 previamente equilibrado y se eliminaron los restos de células del *cumulus oophorus* y los espermatozoides adheridos a la zona pelúcida mediante manipulación mecánica. Seguidamente se lavaron 2 veces en medio NCSU-23 y se cultivaron durante 24 horas en grupos de 45-50 en placas de Petri con 2 ml de medio. Pasado este tiempo, se seleccionaron bajo el estereomicroscopio únicamente aquellos embriones que se encontraban divididos en estadio de 2-4 células (Figura 3.1) y se dispusieron en placas de 2 ml con medio NCSU-23 fresco. El cultivo de embriones se mantuvo en estas condiciones hasta los 8 días postfecundación a 38'5°C de temperatura y 5% de CO₂ en aire saturado de humedad.

Figura 2. **1:** Ovocito porcino en estadio de vesícula germinal (VG). Tinción con lacmoid al 1%, microscopio de contraste de fases, objetivo 40X. **2:** Ovocito en estadio de telofase donde se puede apreciar el huso acromático (H) y los cromosomas en los polos, 100X. **3:** Detalle de un ovocito madurado *in vitro* en estadio de Metafase II con los cromosomas (M) dispuestos en el ecuador del huso acromático y el primer corpúsculo polar (CP), 100X. **4:** Ovocito monospermico con dos pronúcleos (PN) tras ser fecundado *in vitro*, 40X. **5:** Detalle de los dos pronúcleos de la imagen 4 donde se puede apreciar la cola espermática (→). **6:** Ovocito polispermico mostrando varios pronúcleos (PN) y espermatozoides descondensados (D) en el citoplasma, 40X.



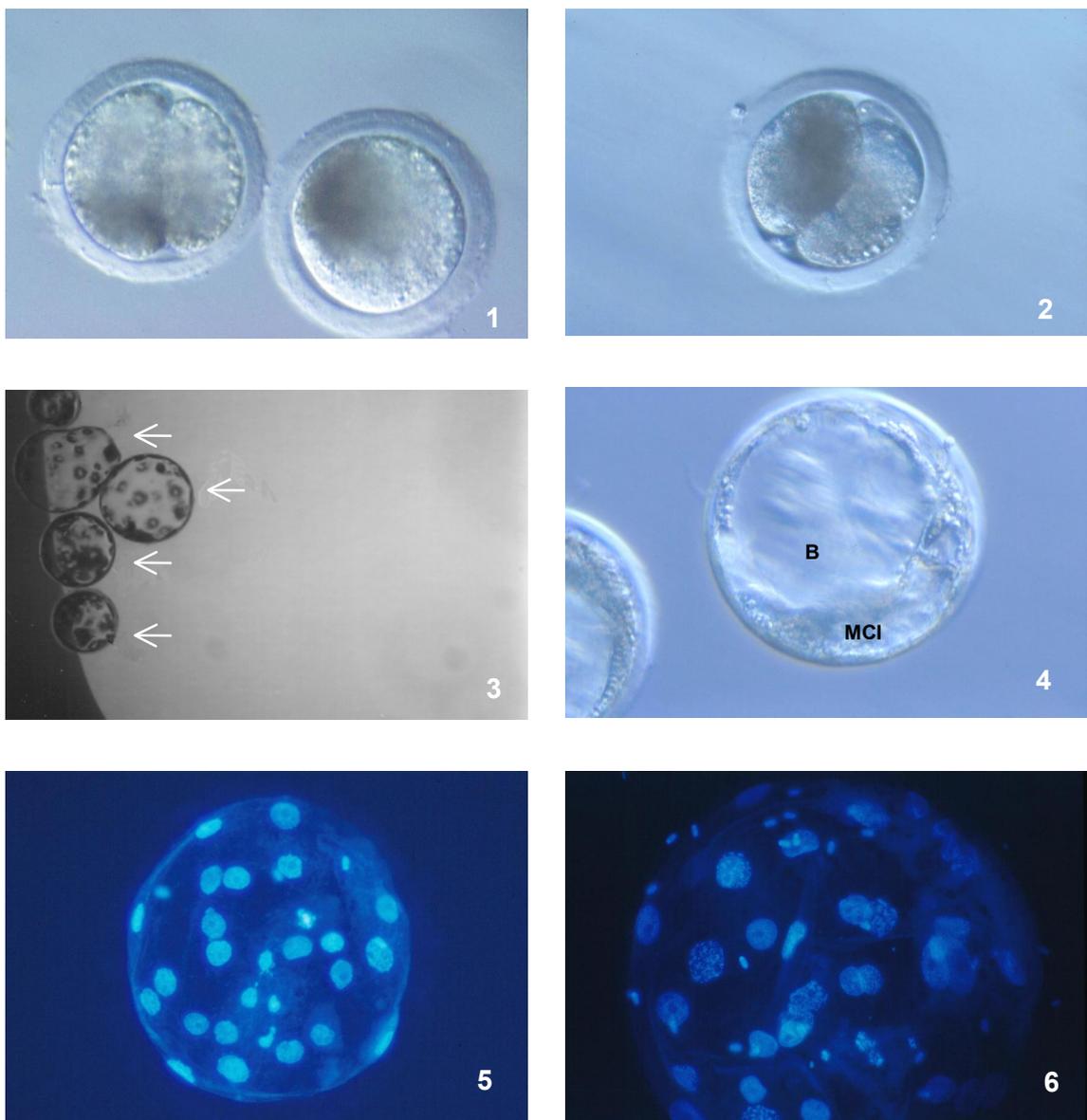
3.6.1 Valoración microscópica de resultados

Se consideraron embriones divididos aquellos que a las 48 horas postfecundación se encontraban en estadio de 2-4 células con blastómeros homogéneos (Figura 3.2). Una vez finalizado el periodo de cultivo, se aislaron bajo el estereomicroscopio a 50 aumentos aquellos embriones con aspecto de blastocisto (Figura 3.3 y 3.4) y se trasladaron a PBS atemperado. Seguidamente se procesaron para valorar la calidad embrionaria según el número de blastómeros por embrión siguiendo la técnica de Dobrinsky et al. (1996). Brevemente, los blastocistos se mantuvieron durante 5 minutos a 38°C en una solución de Hoescht 33342 al 1% en PBS para teñir los núcleos celulares. Pasado el tiempo de tinción se montaron sobre un portaobjetos y se visualizaron inmediatamente en un microscopio de fluorescencia a 400 aumentos y 495 nm de longitud de onda. Se contabilizaron todos los núcleos considerándose el número total de células por blastocisto como el número total de núcleos teñidos (Figuras 3.5 y 3.6).

Las variables estudiadas en esta experiencia se detallan a continuación:

- Porcentaje de división embrionaria (**% División**): se contabilizó el número de embriones en estadio de 2-4 células con respecto al total de los cigotos que iniciaron el cultivo embrionario.
- Porcentaje de blastocistos (**% Blastocistos**): se valoró como el número de blastocistos con respecto al total de embriones divididos.
- Número medio de células por blastocisto (**N céls/blastocisto**): se calculó como el número medio de núcleos teñidos por blastocisto.

Figura 3. **1:** Embrión de 2 células a las 24 horas postfecundación junto a otra célula no dividida, sistema Hoffman, objetivo 40X. **2:** Embrión de 2-4 células a las 48 horas postfecundación, Hoffman, 40X. **3:** Grupo de blastocistos (→) en la placa de cultivo a los 7 días postfecundación. Microscopio de contraste de fases, 10X. **4:** Detalle de un blastocisto cavitado mostrando el blastocele (B) y la masa celular interna (MCI), Hoffman, 40X. **5:** Blastocisto tras la tinción con Hoescht 33342 con los núcleos de los blastómeros teñidos en azul. Microscopio de epifluorescencia, 40X. **6:** Blastocisto teñido con Hoescht 33342, epifluorescencia, 100X.



3.7 DIGESTIÓN DE LA ZONA PELÚCIDA (ZP)

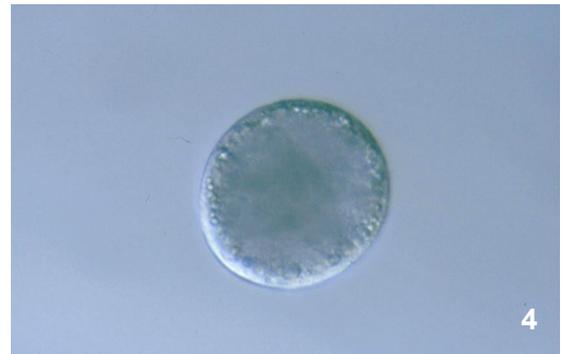
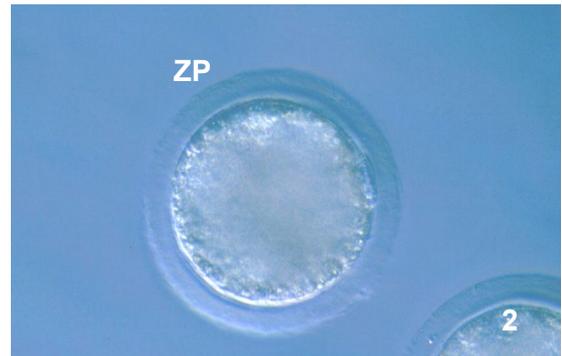
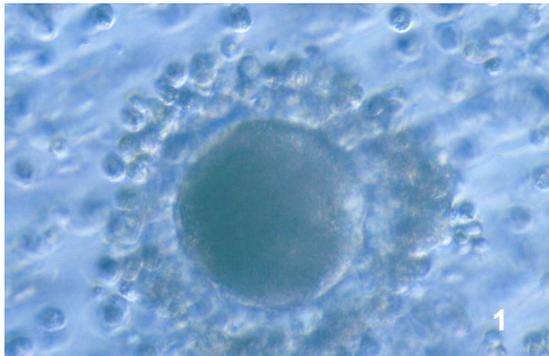
Para los ensayos de digestión de la ZP se siguió la técnica descrita por Wang et al. (1997b) con ligeras modificaciones. Los ovocitos se extrajeron de sus respectivas placas de cultivo (Figura 4.1) y se denudaron mecánicamente tras varios pases a través de una pipeta automática en PBS (Figura 4.2). A continuación se pasaron en grupos de 10 a microgotas de 100 μ l de una solución de pronasa (proteasa de *Streptomyces griseus*; 4 U/mg) al 0'1% en PBS considerándose ese momento como tiempo cero. Los ovocitos se observaron de forma continuada bajo el estereomicroscopio a 50 aumentos (Figura 4.3). El momento en que la zona dejó de ser visible se anotó como tiempo de digestión de la ZP (Figura 4.4). Todo el procesado de las muestras se llevó a cabo a temperatura ambiente.

La variable estudiada en esta experiencia fue el tiempo de digestión de la zona pelúcida medido en segundos (**Tiempo digestión ZP**).

3.8 ESTUDIO DE GRÁNULOS CORTICALES (GC)

Los ovocitos procedentes de las placas de cultivo se denudaron en PBS y se procesaron básicamente según la técnica de Yoshida et al. (1993b) con modificaciones (Wang et al., 1997b). Tras un periodo de fijación de 30 minutos a temperatura ambiente en una solución de formaldehído al 3'7% (w/v) en PBS, se lavaron 3 veces en PBS y se trataron con una solución de Tritón X-100 al 0'1% (v/v) en PBS durante 5 minutos. A continuación, se introdujeron en una solución de lectina procedente de *Arachis hypogaea* (PNA) conjugada a isotiocianato de fluoresceína FITC (PNA-FITC; 100 μ g/ml en PBS). Las muestras se cultivaron con PNA-FITC a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos, tras los que se trataron nuevamente con Tritón X-100 al 0'01% (v/v) en PBS durante 5 minutos. Finalmente, se realizaron 3 lavados en PBS y los ovocitos se montaron sobre portaobjetos manteniéndose a 4°C en oscuridad hasta su estudio.

Figura 4. **1:** Ovocito rodeado por sus células del *cumulus oophorus* expandidas tras la maduración *in vitro*, sistema Hoffman, objetivo 40X. **2:** Ovocito desnudado antes de ser sometido a la digestión de la zona pelúcida (ZP) con pronasa. Hoffman, 40X. **3:** Ovocito en una solución de pronasa al 0'1% en el que se aprecia el inicio de la digestión de la ZP. Hoffman, 40X. **4:** Ovocito en el que la digestión de la ZP se ha completado. Microscopio de contraste de fases, 40X.



3.8 1 Valoración microscópica de resultados

Las muestras se visualizaron en un microscopio (Leica DMRB) con un módulo confocal TCS NT equipado con un láser de Krypto-argon para la excitación de la fluoresceína. Las imágenes se obtuvieron utilizando un objetivo de inmersión (Leica PL APO UV 63'5 x 1.32NA) y se grabaron digitalmente sobre un disco magneto-óptico. En cada ovocito se observaron dos secciones: un primer corte a nivel ecuatorial (Figura 5.1) entendiéndose éste como el punto donde el ovocito alcanza su mayor diámetro, y el segundo a 35-40 μm del plano ecuatorial (Yoshida et al., 1993b; Kim et al., 1996) recibiendo el nombre de córtex (Figura 5.2). Las imágenes de cada uno de estos dos planos se capturaron con el software informático integrado en el equipo de microscopía siendo el grosor de cada corte de aproximadamente 1 μm .

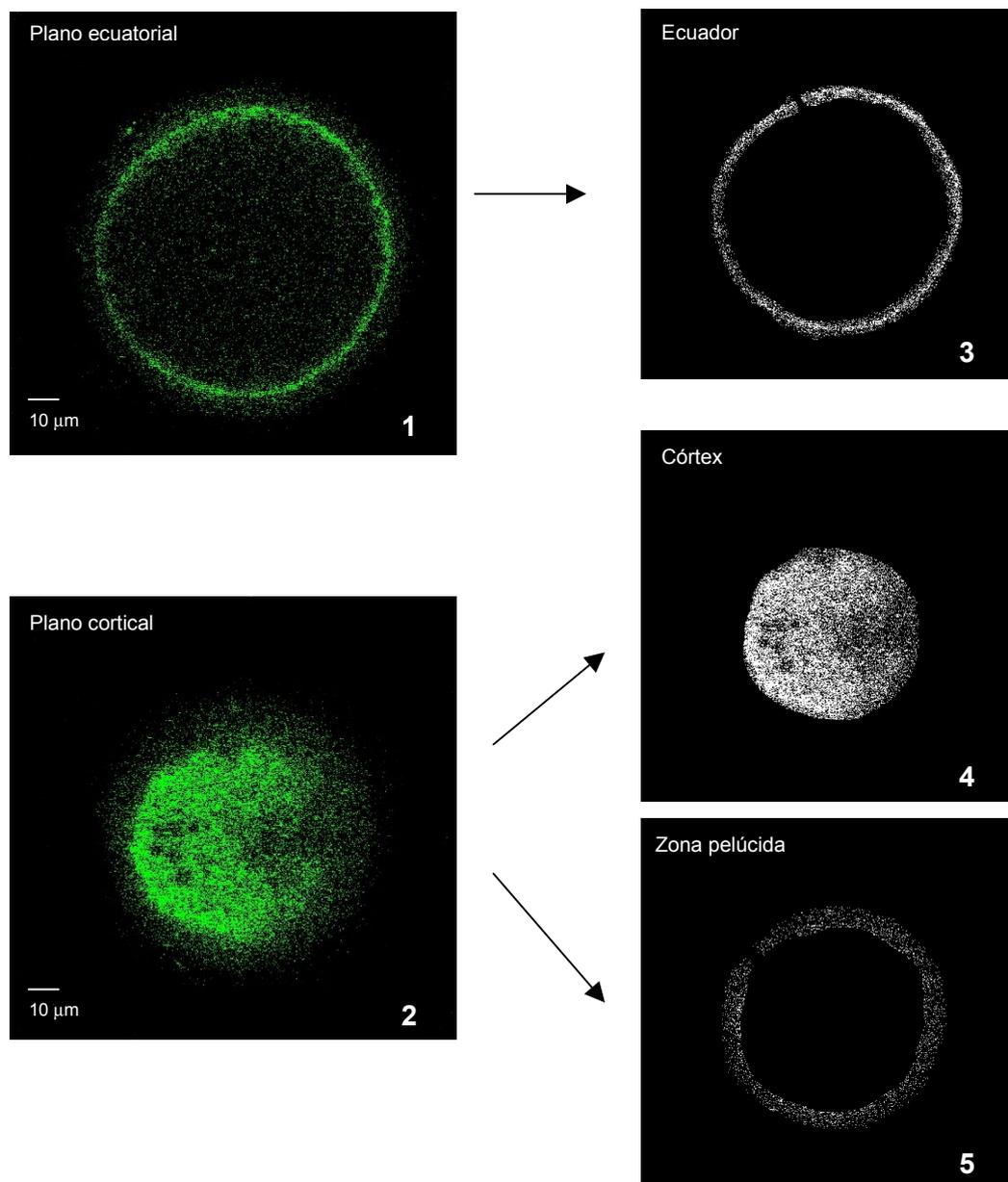
Posteriormente, la densidad de GC de cada ovocito se analizó con un programa informático de análisis de imagen MIP4 (Consulting de imagen digital S.L., Microm, España). En la imagen ecuatorial se realizaron dos círculos concéntricos para aislar el espacio inmediatamente por debajo de la membrana plasmática (Figura 5.3). En este punto se calcularon los datos de área total aislada, área total marcada con lectina, porcentaje de área marcada con respecto al total y número de puntos en el área seleccionada. En la imagen cortical se trazó un círculo para aislar el córtex del ovocito (Figura 5.4) y dos círculos concéntricos alrededor de la ZP (Figura 5.5). En ambos planos se registraron las mismas mediciones que para el ecuador.

Puesto que en algunas ocasiones los GC se observaron en forma de agregados, no se consideró como valor absoluto de GC el calculado por el ordenador. En su lugar, en una región de baja densidad se aislaron un total de 1.300 puntos en varios ovocitos calculándose el área ocupada por cada uno de ellos que arrojó un valor de 0'094 μm^2 y, por consiguiente, un diámetro de 0'34 μm . Por ello, el número final de GC por cada 100 μm^2 de ecuador, córtex o ZP no se midió a través del ordenador sino que se calculó dividiendo el porcentaje de área marcada por 0'094.

Las variables estudiadas en esta experiencia fueron las siguientes:

- Porcentaje de área teñida con PNA-FITC (**% Área**): porcentaje de área teñida frente al área total que ocupa el plano en estudio (ecuador, córtex o ZP).
- Densidad de gránulos corticales (**Número GC/100 μm^2**): se midió como el número medio de gránulos corticales por unidad de superficie (100 μm^2) para cada uno de los planos estudiados.

Figura 5. **1:** Plano ecuatorial de un ovocito teñido con FITC-PNA. Microscopio láser confocal, objetivo 63'5X. **2:** Plano cortical del mismo ovocito de la imagen 1. Confocal, 63'5X. **3:** Zona ecuatorial aislada a partir de la imagen 1 para el recuento de gránulos corticales, capturada con el programa informático MIP4. **4:** Córtex aislado a partir de la imagen 2 para el recuento de gránulos corticales, capturada con el programa informático MIP4. **5:** Zona pelúcida aislada a partir de la imagen 2 para el recuento de gránulos corticales, capturada con el programa informático MIP4.



3.9 DISEÑO EXPERIMENTAL

El trabajo se llevó a cabo en 4 experiencias (Figura 6).

Experiencia 1: caracterización del cultivo de células epiteliales del oviducto porcino

Esta experiencia se realizó con la finalidad de conocer la pureza de los cultivos celulares que se utilizarían a lo largo del trabajo experimental. Para ello, se realizaron cultivos primarios de células epiteliales de oviducto porcino y se practicaron los ensayos de inmunocitoquímica con el objetivo de diferenciar las células epiteliales y no epiteliales. Se contabilizaron 5 campos de 40 aumentos para cada una de las muestras y en cada uno de ellos se contabilizaron las células epiteliales. Esta experiencia se llevó a cabo en 3 replicados para posteriormente sumar los resultados y obtener el porcentaje de células epiteliales con respecto al total de células contabilizadas.

Experiencia 2: estudio del efecto de las células epiteliales del oviducto y las células del *cumulus oophorus* sobre la fecundación *in vitro* y el desarrollo embrionario

Se estudió el efecto de las células oviductales a dos niveles: antes de la fecundación *in vitro* y durante la fecundación *in vitro* con ovocitos rodeados por el cúmulus o desnudados. De este modo la experiencia quedó subdividida en:

Experiencia 2.1: efecto de la preincubación en células oviductales antes de la FIV en ovocitos con cúmulus y desnudados

Los COCs se maduraron *in vitro* y pasado el periodo de cultivo la mitad de ellos se preincubaron durante 3 horas en presencia de una monocapa de células epiteliales previamente equilibrada durante 30 minutos con medio TALP (Grupo Preincubación Sí) y el resto se mantuvo en sus respectivas placas de maduración (Grupo Preincubación NO). A su vez, los ovocitos que se preincubaron se dividieron en ovocitos rodeados (Grupo Cúmulus Sí) o no (Grupo Cúmulus NO) por las células del *cumulus oophorus*.

Antes de la FIV, la mitad de los ovocitos no preincubados se desnudó de forma mecánica y el resto se mantuvo rodeado por las células del cúmulus. A continuación

todos los ovocitos se lavaron en medio TALP previamente equilibrado y se pasaron a microgotas de 90 μ l cubiertas con aceite de parafina en grupos de 45-50. Todos los ovocitos se fecundaron con espermatozoides epididimarios de un único macho, a una concentración de 1.500 espermatozoides/ovocito, en un volumen de 10 μ l y en ausencia de células oviductales.

Los gametos se cocultivaron durante 18-20 horas tras las cuales 14-16 ovocitos por grupo se procesaron para valorar los distintos parámetros de FIV. El resto de los ovocitos se llevaron a cultivo de embriones para estudiar el efecto de la preincubación con células oviductales y de las células del cúmulus sobre el desarrollo embrionario.

Esta experiencia se llevó a cabo en 6 replicados sumándose posteriormente los datos para su análisis conjunto. Todos los cultivos de células oviductales empleados fueron de tipo primario.

Experiencia 2.2: efecto de la presencia de células oviductales durante la FIV en ovocitos con cúmulus y denudados

Una vez finalizado el periodo de MIV, los ovocitos se cambiaron a medio TALP y la mitad se denudó de forma mecánica (Grupo Cúmulus NO) manteniéndose el resto rodeado por las células del cúmulus (Grupo Cúmulus SÍ). Una vez lavados, los ovocitos se fecundaron en grupos de 45-50 en presencia (Grupo POEC SÍ) o ausencia (Grupo POEC NO) de una monocapa de células oviductales previamente equilibrada con 190 μ l de medio TALP durante 30 minutos. Todos los ovocitos se fecundaron con espermatozoides de epidídimo de un único macho, a una concentración de 1.500 espermatozoides/ovocito en un volumen de 10 μ l.

Los gametos se cocultivaron durante 18-20 horas pasadas las cuales se procesaron unos 16-18 ovocitos de cada grupo para valorar los mismos parámetros de FIV que en la experiencia 2.1. El resto de los cigotos se llevaron a CE para estudiar el efecto de la presencia de las células oviductales y las células del cúmulus durante la FIV sobre el desarrollo embrionario.

Esta experiencia se llevó a cabo en 5 replicados analizándose los resultados de todos ellos de forma conjunta.

Experiencia 3: estudio del efecto de las células epiteliales del oviducto y las células del *cumulus oophorus* sobre la resistencia de la zona pelúcida

El objetivo de esta experiencia fue analizar el efecto de las células oviductales y del cúmulus sobre el endurecimiento de la zona pelúcida y su posterior resistencia a la digestión enzimática con pronasa. Al igual que en la experiencia 2, se estudió el efecto de las células antes de la FIV (preincubación con POEC de ovocitos desnudos y con cúmulus) y durante la FIV (fecundación con y sin POEC de ovocitos desnudos o con cúmulus). Así pues, esta experiencia quedó dividida en:

Experiencia 3.1: efecto de la preincubación en células oviductales de ovocitos con cúmulus y desnudos

Se estudió el efecto de la preincubación de ovocitos en presencia o ausencia de células oviductales durante 3 y 6 horas. De este modo, una vez transcurrido el periodo de MIV, un grupo de 10 ovocitos se desnudó mediante pases a través de una pipeta automática en PBS e inmediatamente se puso en contacto con la pronasa para estudiar el tiempo de digestión de la zona pelúcida (Control MIV). Del resto de ovocitos, la mitad se desnudaron, la otra se mantuvo rodeada por sus células del cúmulus y tras dos lavados en medio TALP equilibrado se introdujeron en placas de Petri con 2 ml de medio TALP en presencia o ausencia de una monocapa de células POEC (20 ovocitos/grupo). Los ovocitos se mantuvieron bajo condiciones de 38'5°C de temperatura, 5% de CO₂ en aire y atmósfera saturada de humedad. Pasadas 3 horas de cultivo, se tomaron 10 ovocitos, de cada uno de los cuatro grupos y, tras lavarlos en PBS, se realizó la prueba de digestión de la zona pelúcida (Grupo preincubación 3 horas). El resto se mantuvo en cultivo durante otras 3 horas tras las cuales otros 10 ovocitos se procesaron igualmente con la enzima para estudiar los tiempos de digestión (Grupo preincubación 6 horas).

Se realizaron 5 replicados consecutivos y los resultados de todos ellos se analizaron de forma conjunta.

Experiencia 3.2: efecto de la presencia de células oviductales durante la FIV en ovocitos con cúmulus y desnudados

Para esta experiencia los ovocitos se manipularon y se fecundaron tras el periodo de MIV bajo las mismas condiciones que en la experiencia 2.2. Al igual que en el caso de la experiencia anterior, 10 ovocitos se procesaron para la prueba de digestión de la zona pelúcida con pronasa justo tras la MIV (Control MIV). La FIV se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que la experiencia 2.2 y a las 3 horas de la fecundación se tomaron 10 ovocitos de cada grupo que tras ser lavados en PBS se pusieron en contacto con pronasa para realizar el ensayo de digestión de la ZP.

Para esta experiencia se desarrollaron 6 replicados consecutivos sumando todos los resultados para su posterior análisis estadístico.

Experiencia 4: estudio del efecto de las células epiteliales del oviducto y del *cumulus oophorus* sobre la densidad y distribución de los gránulos corticales

Como en las experiencias 2 y 3, el objetivo fue estudiar el efecto de las células oviductales a dos niveles (antes y durante la FIV) empleando ovocitos desnudados o con cúmulus. De este modo esta experiencia se subdividió en:

Experiencia 4.1: efecto de la preincubación en células oviductales de ovocitos con cúmulus y desnudados

Al igual que en el caso de la experiencia 3.1, se estudió el efecto de la preincubación en células oviductales de ovocitos con cúmulus y desnudados. Ambos tipos de ovocitos se incubaron en POEC 3 y 6 horas y se estudió su efecto sobre la densidad y distribución de los gránulos corticales. Para ello, tras la MIV, un grupo de 10 ovocitos se procesó para el estudio del patrón de gránulos corticales (Control MIV) y el resto se manipuló bajo las mismas condiciones que la experiencia 3.1. Transcurridas 3 y 6 horas respectivamente del cocultivo de los ovocitos, con cúmulus y desnudados, con y sin células POEC éstos se procesaron para su posterior análisis de gránulos corticales (5 ovocitos por grupo).

Se realizaron 4 replicados consecutivos y los resultados de todos ellos se analizaron de forma conjunta.

Experiencia 4.2: efecto de la presencia de células oviductales durante la FIV en ovocitos con cúmulus y denudados

Inmediatamente tras la MIV se tomó un grupo de 10 ovocitos (Control MIV) para su análisis. El resto se manipuló y fecundó tal y como se ha descrito en la experiencia 2.2. A las 3 horas postFIV, 10 ovocitos de cada grupo se trataron para el estudio de gránulos corticales.

Se realizaron un total de 4 replicados analizándose los resultados de cada grupo de forma conjunta.

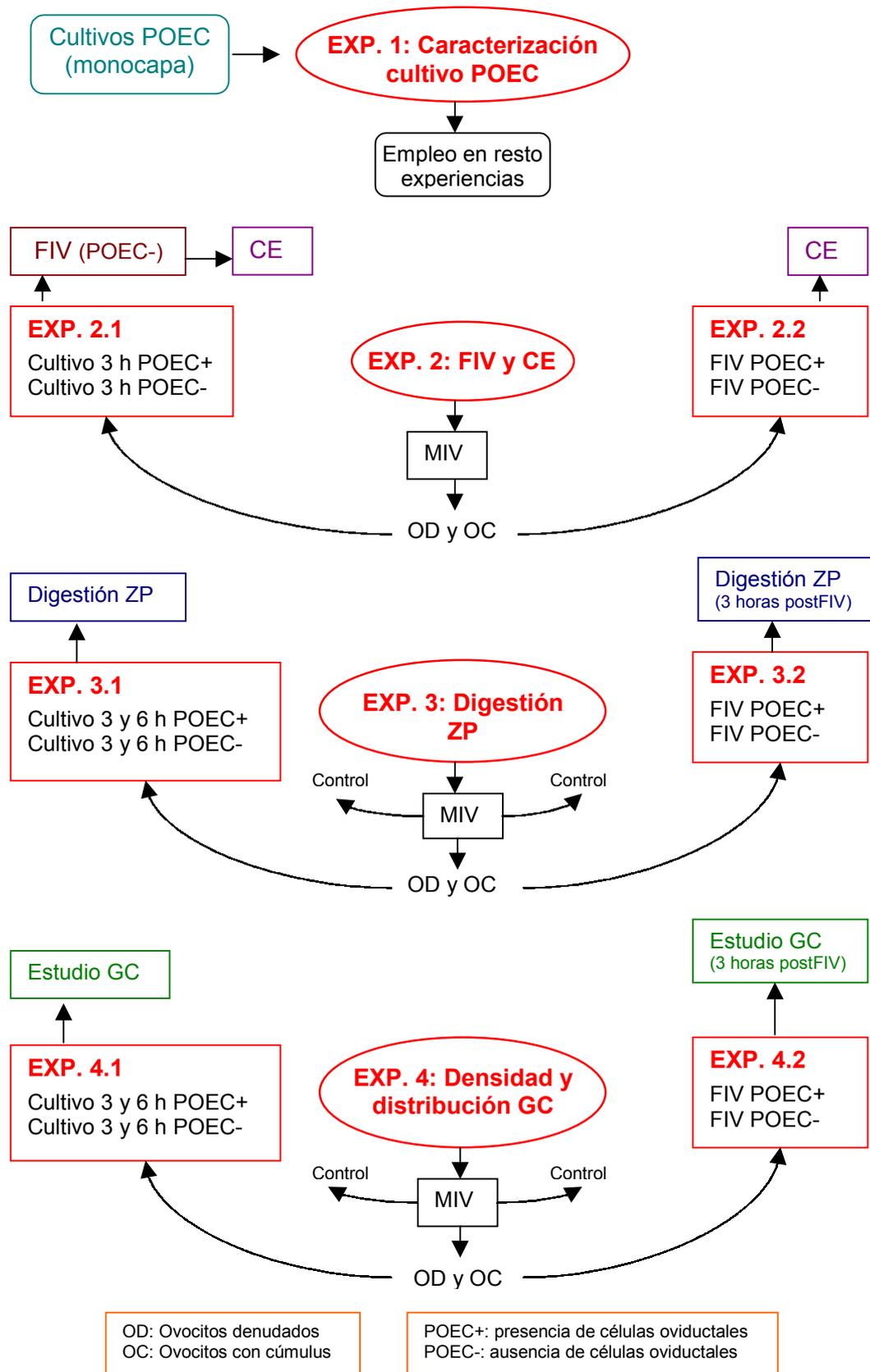
3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El número de espermatozoides por ovocito penetrado y el número de células por blastocisto se expresa como media \pm SEM (error estándar de la media). En todos los casos los porcentajes fueron transformados según el modelo binomial de parámetros.

En todas las experiencias los datos fueron analizados por un ANOVA de dos vías donde los efectos fijos fueron la presencia o ausencia de las células oviductales (POEC) y la presencia o ausencia de las células del cúmulus (Cúmulus).

Para todo el análisis estadístico se utilizó el General Linear Models del programa informático SYSTAT 9.0 y cuando el ANOVA reveló un efecto significativo los valores fueron comparados por el test de Tukey. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas que alcanzaron niveles de probabilidad de $p < 0.05$.

Figura 6. Diseño experimental.



RESULTADOS

4. RESULTADOS

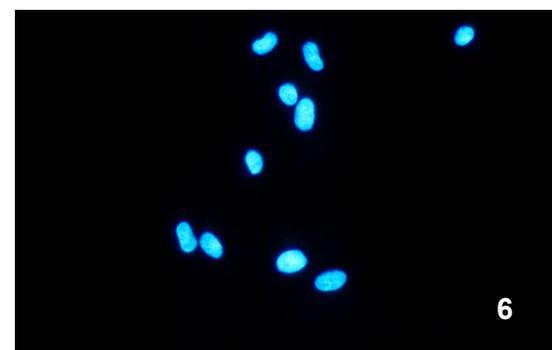
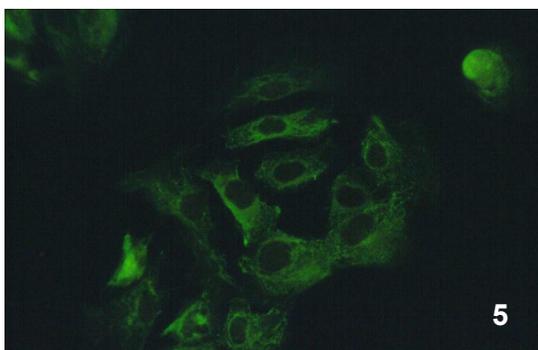
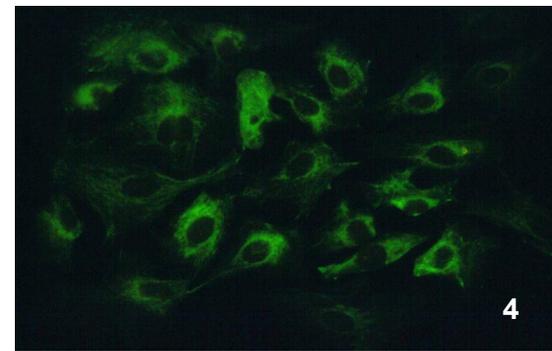
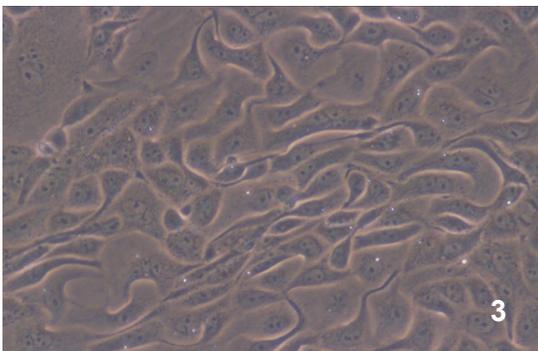
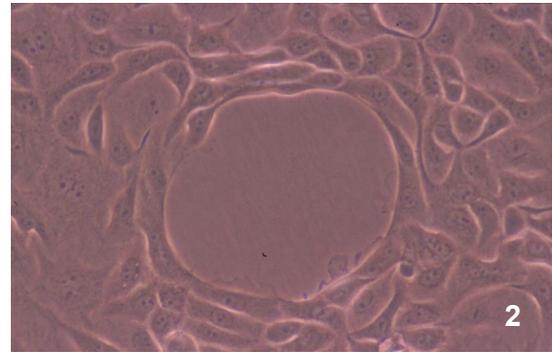
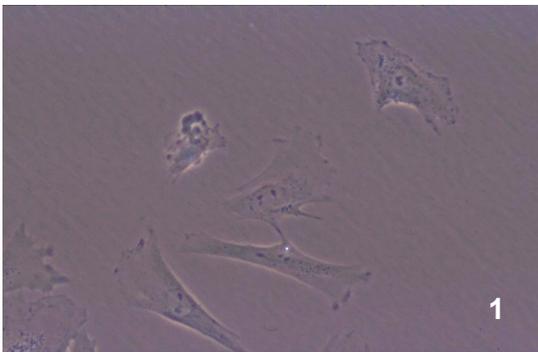
En este apartado se detallan los resultados obtenidos en el presente trabajo experimental siguiendo la metodología descrita.

4.1 ANÁLISIS DE LA PUREZA DEL CULTIVO DE CÉLULAS OVIDUCTALES

En las suspensiones celulares recogidas en fresco tras la digestión enzimática se observaron tanto células ciliadas como no ciliadas. El progreso adecuado del cultivo celular se confirmó mediante la adhesión de las células oviductales (Figura 7.1) y el inicio de la multiplicación celular (Figura 7.2) hasta su confluencia en una monocapa, aproximadamente a los 7 días de cultivo (Figura 7.3). Además, de las observaciones rutinarias de la morfología celular también se observó el movimiento ciliar con microscopía de contraste de fases.

Las pruebas de inmunocitoquímica para los filamentos de citoqueratina detectaron que un $99'30 \pm 1'85\%$ de las células oviductales de las monocapas que crecieron *in vitro* fueron epiteliales (positivas al marcaje con la anticitoqueratina 8.13; Figura 7.4). La correcta tinción del citoesqueleto celular (Figura 7.5) así como de los núcleos (Figura 7.6) se observó mayoritariamente en las muestras de todos los replicados lo que sugiere que el crecimiento celular *in vitro* se llevó a cabo de manera satisfactoria.

Figura 7. **1:** Células oviductales adheridas al fondo de la placa de Petri a las 72 horas de cultivo. Microscopio de contraste de fases, objetivo 40X. **2:** Células oviductales a los 5 días de cultivo mostrando un área todavía sin tapizar. Contraste de fases, 40X. **3:** Monocapa confluyente de células epiteliales de oviducto porcino a los 7 días de cultivo. Contraste de fases, 40X. **4:** Células epiteliales de oviducto porcino. Inmunotinción con anticitoqueratina 8.13 mostrando la tinción positiva del citoplasma. Microscopio de epifluorescencia, 40X. **5:** Células epiteliales de oviducto porcino con el citoesqueleto teñido tras inmunotinción con antitubulina E7, epifluorescencia, 40X. **6:** Células oviductales con los núcleos teñidos con Hoescht 33342 para su recuento, epifluorescencia, 40X.



4.2 EFECTO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DEL OVIDUCTO Y DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULUS SOBRE LOS RESULTADOS DE LA FECUNDACIÓN *IN VITRO* Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Tal y como se ha descrito en el diseño experimental, los resultados de esta experiencia se desglosan en el efecto de ambos tipos celulares durante la preincubación de ovocitos (antes de la FIV) y durante el proceso de FIV.

4.2.1 Efecto, sobre la FIV y el CE, de la preincubación en células oviductales antes de la FIV de ovocitos con cúmulus y denudados

El cocultivo de los ovocitos durante 3 horas con células epiteliales del oviducto antes de la FIV no influyó sobre ninguno de los parámetros de fecundación estudiados tal y como se refleja en la tabla 6. La presencia de las células del cúmulus mostró una tendencia ($p=0'06$) para los valores de penetración que fueron mayores en los ovocitos rodeados por las células del cúmulus que en los denudados. Si nos centramos exclusivamente en los ovocitos preincubados, las penetraciones fueron similares entre los denudados y los fecundados con cúmulus (93'51 vs. 92'22). Además, la presencia de células del cúmulus incrementó significativamente el número medio de espermatozoides por ovocito, tanto en los preincubados como en los no preincubados, no observándose ningún efecto del cúmulus sobre la formación de pronúcleo masculino tras la FIV, que en todos los grupos se situó por encima del 90%.

En cuanto a los resultados de monospermia, la presencia de las células del cúmulus presentó un efecto desfavorecedor sobre la misma ($p<0'001$) alcanzándose los mejores resultados en los ovocitos denudados. Sin embargo este efecto no se observó de forma significativa cuando los ovocitos se preincubaron con células oviductales antes de la FIV (25 vs. 11'27).

Los resultados de penetrabilidad entre los 6 replicados de esta experiencia se mantuvieron constantes para los distintos grupos (Tabla 6.1).

Tabla 6. Resultados tras la fecundación de ovocitos no preincubados (Preincubación NO) o preincubados con células epiteliales del oviducto (Preincubación SÍ) rodeados por sus células del cúmulus (Cúmulus SÍ) o denudados (Cúmulus NO): N (número de ovocitos), E/O (número medio de espermatozoides por ovocito), % PNM (formación de pronúcleo masculino).

Preincubación	Cúmulus	N	% Penetración	E/O	% PNM*	% Monospermia*
NO	NO	83	83'13 ± 4'14a	2'10 ± 0'14a	95'65 ± 2'47	43'48 ± 6'01a
	SÍ	81	96'30 ± 2'11b	4'50 ± 0'24b	98'72 ± 1'28	6'41 ± 2'79b
SÍ	NO	77	93'51 ± 2'83ab	2'51 ± 0'17a	91'67 ± 3'28	25'00 ± 5'14c
	SÍ	77	92'22 ± 3'07ab	4'08 ± 0'26b	97'18 ± 1'98	11'27 ± 3'78bc
Fuente de variabilidad						
Preincubación			0'319	0'994	0'238	0'132
Cúmulus			0'060	<0'001	0'067	<0'001
Preincubación x Cúmulus			0'022	0'056	0'600	0'010

*Del total de los ovocitos penetrados

a, b, c: Distintos marcadores en la misma columna indican valores significativamente diferentes ($p < 0'05$)

Tabla 6.1. Rangos de penetrabilidad para cada uno de los grupos en los 6 replicados: E/O (número medio de espermatozoides por ovocito).

Preincubación	Cúmulus	% Penetración	E/O
NO	NO	66'67 - 94'44	1'50 - 2'12
	SÍ	72'73 - 100	2'37 - 6'00
SÍ	NO	90'32 - 100	2'17 - 3'11
	SÍ	88'89 - 100	2'9 - 5'10

Los resultados sobre el desarrollo embrionario (Tabla 7) mostraron que los embriones procedentes de los ovocitos no preincubados con POEC alcanzaron un porcentaje de división significativamente mayor al de los ovocitos preincubados ($p=0'019$), mientras que las células del cúmulus no evidenciaron ningún efecto sobre este parámetro. En el porcentaje de blastocistos se apreció un efecto negativo de la preincubación en POEC ($p < 0'001$) y una tendencia para las células del cúmulus ($p=0'056$) en el mismo sentido negativo. De este modo, en el grupo de ovocitos no preincubados se obtuvieron mayores porcentajes de blastocistos en los ovocitos denudados que en los fecundados rodeados por sus células del cúmulus. Sin

embargo, al preincubar los ovocitos con POEC antes de la FIV estas diferencias no aparecieron.

Tabla 7. Resultados del desarrollo embrionario de los ovocitos fecundados no preincubados (Preincubación NO) o preincubados con células epiteliales del oviducto (Preincubación SÍ) rodeados por sus células del cúmulus (Cúmulus SÍ) o denudados (Cúmulus NO): N céls/blastocisto (número medio de células por blastocisto).

Preincubación	Cúmulus	N	% División	% Blastocistos*	N céls/blastocisto
NO	NO	360	80'56 ± 2'09	30'69 ± 2'71a	20'47 ± 1'17
	SÍ	383	80'42 ± 2'03	21'43 ± 2'34b	18'17 ± 1'26
SÍ	NO	317	74'13 ± 2'46	17'45 ± 2'48b	20'04 ± 1'49
	SÍ	322	76'40 ± 2'37	17'07 ± 2'40b	19'47 ± 2'01
Fuente de variabilidad					
Preincubación			0'019	<0'001	0'784
Cúmulus			0'633	0'056	0'366
Preincubación x Cúmulus			0'590	0'078	0'583

*Del total de los ovocitos divididos

a, b: Distintos marcadores en la misma columna indican valores significativamente diferentes ($p < 0'05$)

Finalmente, ni la preincubación ovocitaria ni las células del cúmulus afectaron a la calidad final de los blastocistos obtenidos valorada como el número medio de células por embrión, que fue igual para todos los grupos.

4.2.2 Efecto, sobre la FIV y el CE, de la presencia de células oviductales durante la FIV de ovocitos con cúmulus y denudados

La presencia de la monocapa de células oviductales durante la fecundación de ovocitos con espermatozoides de epidídimo incrementó la penetrabilidad de forma significativa (Tabla 8), tanto para el porcentaje de penetración ($p=0'010$) como para el número medio de espermatozoides por ovocito ($p < 0'001$).

En cuanto al efecto de las células del cúmulus, los ovocitos rodeados por éstas mostraron una tendencia a ser más penetrados que los denudados ($p=0'054$). Se observó un efecto significativo sobre el número de espermatozoides por ovocito

($p=0.027$), alcanzando el grupo de ovocitos fecundados en presencia de ambos tipos celulares el mayor valor (3'29 espermatozoides/ovocito) y siendo diferente con respecto a los grupos fecundados en ausencia de POEC.

Al igual que en el caso de la experiencia 4.2.1, ni las células oviductales ni las del cúmulus durante la FIV influyeron sobre el porcentaje de formación de pronúcleo masculino que nuevamente se situó en torno al 90% para todos los grupos. Del mismo modo, no se observó efecto por parte de ninguno de los dos tipos celulares sobre los resultados finales de monospermia que oscilaron entre el 21'62 y el 35'71%, correspondiéndose este último valor al grupo de ovocitos fecundados en ausencia de ambos tipos celulares.

Tabla 8. Resultados tras la fecundación de ovocitos en presencia (POEC Sí) o ausencia (POEC NO) de células oviductales rodeados por sus células del cúmulus (Cúmulus Sí) o denudados (Cúmulus NO): E/O (número medio de espermatozoides por ovocito), % PNM (formación de pronúcleo masculino).

POEC	Cúmulus	N	% Penetración	E/O	% PNM*	% Monospermia*
NO	NO	73	76'71 ± 4'98a	2'12 ± 0'19a	89'29 ± 4'17	35'71 ± 6'46
	Sí	70	88'57 ± 3'83ab	2'33 ± 0'15a	93'55 ± 3'15	30'65 ± 5'90
Sí	NO	78	91'03 ± 3'26b	2'59 ± 0'20ab	91'55 ± 3'32	30'99 ± 5'53
	Sí	79	93'67 ± 2'76b	3'29 ± 0'24b	93'24 ± 2'94	21'62 ± 4'82

Fuente de variabilidad

POEC	0'010	<0'001	0'772	0'225
Cúmulus	0'054	0'027	0'379	0'202
POEC x Cúmulus	0'220	0'237	0'704	0'704

*Del total de los ovocitos penetrados

a, b: Distintos marcadores en la misma columna indican valores significativamente diferentes ($p<0.05$)

Los resultados entre los 5 replicados de esta experiencia (Tabla 8.1) mostraron una baja variabilidad.

Tabla 8.1. Rangos de penetrabilidad para cada uno de los grupos en los 5 replicados: E/O (número medio de espermatozoides por ovocito).

POEC	Cúmulus	% Penetración	E/O
NO	NO	65'00 - 90'32	1'50 - 5'00
	SÍ	62'50 - 100	1'40 - 4'18
SÍ	NO	66'60 - 100	1'25 - 3'55
	SÍ	81'80 - 100	1'40 - 6'2

Cuando se analizan los datos del cultivo de embriones (Tabla 9), se observa que la presencia o ausencia de células oviductales durante la FIV no afecta a ninguno de los parámetros de desarrollo embrionario aquí estudiados, aunque existe una tendencia de estas células, cuando están presentes durante la FIV, a incrementar el porcentaje de cigotos que se dividen ($p=0'07$).

Tabla 9. Resultados del desarrollo embrionario de los ovocitos fecundados desnudos (Cúmulus NO) o con cúmulus (Cúmulus SÍ) en ausencia (POEC NO) o presencia (POEC SÍ) de células oviductales: N céls/blastocisto (número medio de células por blastocisto).

POEC	Cúmulus	N	% División	% Blastocistos*	N céls/blastocisto
NO	NO	320	59'37 ± 2'75a	21'58 ± 2'99	22'65 ± 1'98
	SÍ	305	71'48 ± 2'59b	17'89 ± 2'60	19'00 ± 1'21
SÍ	NO	349	68'48 ± 2'49ab	14'64 ± 2'29	20'00 ± 1'74
	SÍ	288	71'87 ± 2'65b	16'91 ± 2'61	16'94 ± 1'15

Fuente de variabilidad

POEC	0'070	0'130	0'160
Cúmulus	0'003	0'785	0'046
POEC x Cúmulus	0'098	0'255	0'858

*Del total de los ovocitos divididos

a, b: Distintos marcadores en la misma columna indican valores significativamente diferentes ($p<0'05$)

Por el contrario, sí se observó un efecto positivo de las células del cúmulus sobre los porcentajes de división embrionaria ($p=0'003$) y el número final de blastómeros por embrión ($p=0'046$), aunque no sobre el porcentaje de blastocistos.

Así, en el caso de ausencia de células oviductales durante la FIV, los ovocitos rodeados por el cúmulus alcanzaron cotas de división significativamente mayores que los denudados (71'48 vs. 59'37). Este efecto no se observó en los embriones provenientes de ovocitos fecundados en presencia de células oviductales.

4.3 EFECTO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DEL OVIDUCTO Y DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULUS SOBRE LA RESISTENCIA DE LA ZONA PELÚCIDA (ZP)

Los resultados de esta experiencia se analizaron valorando el efecto de la presencia o ausencia de células oviductales y del cúmulus durante la preincubación de ovocitos (antes de la FIV) y durante la FIV.

4.3.1 Efecto de la preincubación en células oviductales de ovocitos con cúmulus y denudados sobre la resistencia de la ZP

Ni la preincubación de ovocitos en presencia o ausencia de células oviductales, durante 3 ó 6 horas, ni la presencia o ausencia de cúmulus durante este tiempo influyeron sobre los resultados de la digestión de la zona pelúcida con pronasa (Tabla 10). Únicamente se observó una tendencia de las células del cúmulus ($p=0'060$) a incrementar el tiempo de digestión en los ovocitos preincubados 3 horas.

Tabla 10. Tiempos de digestión de la zona pelúcida de ovocitos denudados (Cúmulus NO) o con cúmulus (Cúmulus SÍ) preincubados 3 ó 6 horas en ausencia (POEC NO) o presencia (POEC SÍ) de células epiteliales del oviducto.

POEC	Cúmulus	Preincubación 3 horas		Preincubación 6 horas	
		N	Tiempo digestión ZP (segundos)	N	Tiempo digestión ZP (segundos)
NO	NO	46	484'35 ± 50'23	46	464'04 ± 70'37
	SÍ	47	561'47 ± 76'32	46	437'15 ± 70'22
SÍ	NO	46	422'71 ± 33'10	46	411'00 ± 44'20
	SÍ	44	568'64 ± 66'39	46	452'06 ± 51'36

Fuente de variabilidad

POEC	0'644	0'751
Cúmulus	0'060	0'906
POEC x Cúmulus	0'560	0'572

Control MIV: N= 50. Tiempo digestión ZP= 400'36 ± 61'75 segundos

El tiempo medio de digestión de la zona pelúcida tras el periodo de MIV fue de algo más de 6 minutos (400'36 segundos) y, aunque tras el tratamiento todos los grupos alcanzaron tiempos de digestión mayores, ninguno presentó diferencias significativas con el control. Igualmente se observó que los tiempos de digestión de todos los grupos fueron mayores a las 3 que a las 6 horas de preincubación.

4.3.2 Efecto de la presencia de células oviductales durante la FIV de ovocitos con cúmulus y denudados sobre la resistencia de la ZP

Ni la presencia de células oviductales ni de las células del cúmulus durante la FIV tuvieron efecto sobre los resultados de digestión de la zona pelúcida de los ovocitos evaluada a las 3 horas postfecundación (Tabla 11). Igualmente ninguno de los grupos mostró diferencias significativas con respecto al control evaluado en los ovocitos inmediatamente tras la maduración *in vitro*.

Tabla 11. Tiempos de digestión de la zona pelúcida a las 3 horas de la FIV de ovocitos denudados (Cúmulus NO) o con cúmulus (Cúmulus SÍ) en ausencia (POEC NO) o presencia (POEC SÍ) de células epiteliales del oviducto.

POEC	Cúmulus	N	Tiempo digestión ZP (segundos)
NO	NO	58	369'17 ± 43'55
	SÍ	58	317'63 ± 25'75
SÍ	NO	58	378'86 ± 26'04
	SÍ	57	405'77 ± 38'19
Fuente de variabilidad			
POEC			0'154
Cúmulus			0'719
POEC x Cúmulus			0'253
Control MIV: N= 28. Tiempo digestión ZP= 366'35 ± 55'14 segundos			

En cualquier caso y para todos los grupos, los tiempos de digestión de la ZP fueron del orden de 1 a 2 minutos menos en los ovocitos fecundados (Tabla 11) que en los no fecundados (Tabla 10).

4.4 EFECTO DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DEL OVIDUCTO Y DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULUS SOBRE LA DENSIDAD Y DISTRIBUCIÓN DE LOS GRÁNULOS CORTICALES

Al igual que en los casos anteriores, la experiencia se subdividió en dos para estudiar el efecto de las células sobre los ovocitos antes de la FIV y durante la misma.

4.4.1 Efecto, sobre la densidad y distribución de los GC, de la preincubación en células oviductales de ovocitos con cúmulus y desnudos

En los ovocitos preincubados durante 3 horas tras el periodo de MIV (Tabla 12), el porcentaje de área marcada por los GC en el plano ecuatorial fue similar entre los distintos grupos sin observarse un efecto ni de la presencia o ausencia de POEC durante este tiempo ni de las células del cúmulus; oscilando los valores de GC/100 μm^2 entre 167'04 y 254'92. En el plano cortical y la ZP, no se apreció ningún efecto de la preincubación en POEC aunque las células del cúmulus sí ejercieron un efecto significativo sobre los resultados ($p=0'025$; $<0'001$). Así, el número de GC en el córtex de los ovocitos desnudos no preincubados fue mayor que el de los ovocitos preincubados con cúmulus (554'96 vs. 314'50). Por su parte, la ZP de los ovocitos con cúmulus presentó una menor densidad de GC que la de los desnudos, aunque sólo fueron diferentes los grupos de ovocitos con cúmulus preincubados sin POEC de los ovocitos desnudos preincubados en POEC (44'06 vs. 128'98).

En cuanto a los ovocitos preincubados durante un tiempo de 6 horas (Tabla 13), la tendencia fue a incrementarse los valores de GC en todos los grupos y a todos los niveles con respecto a los ovocitos cultivados durante un tiempo de 3 horas pero no se observó un efecto significativo de las células POEC ni del cúmulus en ninguno de los tres planos estudiados. Las interacciones significativas afectaron los resultados de GC en el córtex y la zona pelúcida. Así pues, en los ovocitos cultivados 6 horas en medio TALP en ausencia de células POEC, los ovocitos desnudos alcanzaron un porcentaje de área teñida significativamente mayor al de los ovocitos rodeados por el cúmulus tanto en el córtex como en la ZP (70'24 vs. 52'16% y 29'87 vs. 7'74% respectivamente). En los ovocitos cultivados con POEC la densidad de GC en el córtex es similar entre desnudos y con cúmulus pero, curiosamente, a nivel de la ZP se invierten los resultados con respecto a los no preincubados ya que la densidad de GC es menor en los desnudos que en los rodeados por el cúmulus (7'74 vs. 29'87 y 10'79 vs. 24'41).

Tabla 12. Porcentaje de área ocupada por gránulos corticales (% Área) y número de gránulos corticales por cada 100 μm^2 (GC/100 μm^2) en el ecuador, córtex y zona pelúcida de ovocitos **preincubados 3 horas** en ausencia (POEC NO) o presencia (POEC Sí) de células epiteliales del oviducto con cúmulus (Cúmulus Sí) o denudados (Cúmulus NO).

POEC	Cúmulus	N	ECUADOR		CÓRTEX		ZONA PELÚCIDA	
			% Área	GC/100 μm^2	% Área	GC/100 μm^2	% Área	GC/100 μm^2
NO	NO	15	23'96 ± 1'61	254'92 ± 17'16	52'16 ± 2'15a	554'96 ± 22'88a	9'57 ± 0'63ab	101'89 ± 6'71ab
	SÍ	17	15'70 ± 1'89	167'04 ± 20'16	37'78 ± 4'10ab	401'99 ± 43'64ab	4'14 ± 0'93a	44'06 ± 9'92a
SÍ	NO	13	19'27 ± 5'08	205'00 ± 54'14	39'25 ± 9'08ab	417'55 ± 96'62ab	12'12 ± 3'61b	128'98 ± 38'43b
	SÍ	16	19'35 ± 3'97	205'94 ± 42'26	29'56 ± 5'14b	314'50 ± 54'78b	5'96 ± 0'52ab	63'43 ± 5'58ab

Fuente de variabilidad

POEC 0'875 0'490 0'177

Cúmulus 0'220 0'025 <0'001

POEC x Cúmulus 0'210 0'656 0'812

Control MIV: N= 33 22'54 ± 2'53 239'86 ± 27'01 44'77 ± 3'64 476'31 ± 38'81 11'98 ± 2'07 127'50 ± 22'08

Tabla 13. Porcentaje de área ocupada por gránulos corticales (% Área) y número de gránulos corticales por cada 100 μm^2 (GC/100 μm^2) en el ecuador, córtex y zona pelúcida de ovocitos **preincubados 6 horas** en presencia (POEC SÍ) o ausencia (POEC NO) de células epiteliales del oviducto con cúmulus (Cúmulus SÍ) o denudados (Cúmulus NO).

POEC	Cúmulus	N	ECUADOR		CÓRTEX		ZONA PELÚCIDA	
			% Área	GC/100 μm^2	% Área	GC/100 μm^2	% Área	GC/100 μm^2
NO	NO	14	44'76 ± 6'01	476'18 ± 63'98	70'24 ± 3'75a	747'23 ± 39'95a	29'87 ± 5'30a	317'78 ± 56'42a
	SÍ	14	37'95 ± 3'73	403'77 ± 39'70	52'16 ± 3'37b	554'99 ± 35'88b	7'74 ± 1'15b	82'40 ± 12'25b
SÍ	NO	19	47'67 ± 4'40	507'46 ± 46'89	56'27 ± 3'90ab	594'25 ± 39'50ab	10'79 ± 1'11b	114'82 ± 11'90b
	SÍ	18	44'77 ± 5'81	476'35 ± 61'87	60'39 ± 4'86ab	642'50 ± 51'76ab	24'41 ± 3'68a	262'54 ± 37'04a

Fuente de variabilidad

POEC	0'351	0'495	0'704
Cúmulus	0'353	0'100	0'184
POEC x Cúmulus	0'707	0'010	<0'001

Control MIV: N= 33	22'54 ± 2'53	239'86 ± 27'01	44'77 ± 3'64	476'31 ± 38'81	11'98 ± 2'07	127'50 ± 22'08
--------------------	--------------	----------------	--------------	----------------	--------------	----------------

4.4.2 Efecto, sobre la densidad y distribución de los GC, de la presencia de células oviductales durante la FIV de ovocitos con cúmulus y desnudados

El análisis de los gránulos corticales en los ovocitos fecundados reveló que no existen diferencias significativas entre grupos para los distintos planos estudiados (Tabla 14). Sin embargo, en los tres niveles, los valores fueron significativamente menores que en los ovocitos control analizados inmediatamente tras la MIV ($p < 0'001$).

Tabla 14. Porcentaje de área ocupada por gránulos corticales (% Área) y número de gránulos corticales por cada 100 μm^2 (GC/100 μm^2) en el ecuador, córtex y zona pelúcida de ovocitos a las **3 horas después de la FIV** en presencia (POEC Sí) o ausencia (POEC NO) de células epiteliales del oviducto de ovocitos con cúmulus (Cúmulus Sí) o denudados (Cúmulus NO).

POEC	Cúmulus	N	ECUADOR		CÓRTEX		ZONA PELÚCIDA	
			% Área	GC/100 μm^2	% Área	GC/100 μm^2	% Área	GC/100 μm^2
NO	NO	35	2'86 ± 0'28	30'45 ± 3'01	11'01 ± 1'60	117'19 ± 17'08	1'33 ± 0'40	14'16 ± 4'33
	SÍ	32	2'48 ± 0'26	26'44 ± 2'78	7'80 ± 0'85	82'98 ± 9'10	0'72 ± 0'12	7'73 ± 1'36
SÍ	NO	34	2'46 ± 0'31	26'18 ± 3'34	10'22 ± 1'32	108'75 ± 14'09	1'04 ± 0'19	11'06 ± 2'10
	SÍ	35	2'93 ± 0'28	31'20 ± 3'07	9'53 ± 0'98	101'40 ± 10'50	0'96 ± 0'16	10'26 ± 1'70

Fuente de variabilidad

POEC	0'936	0'710	0'916
Cúmulus	0'869	0'123	0'183
POEC x Cúmulus	0'144	0'317	0'298

Control MIV: N= 33	22'54 ± 2'53	239'86 ± 27'01	44'77 ± 3'64	476'31 ± 38'81	11'98 ± 2'07	127'50 ± 22'08
--------------------	--------------	----------------	--------------	----------------	--------------	----------------

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Se ha demostrado por distintos autores que las células epiteliales procedentes de oviductos de cerdas prepúberes sacrificadas en matadero pueden ser aisladas y utilizadas en el laboratorio para su crecimiento en cultivos primarios (Nagai y Moor, 1990; Fazeli et al., 1999; Romar et al., 2001). Tal y como se ha observado en este trabajo, el método enzimático para el aislamiento celular resulta práctico ya que no requiere un procesamiento demasiado largo, el número de células obtenidas es elevado, no precisa de una gran cantidad de material, es fácil de realizar, altamente repetible y no daña las células, que posteriormente son capaces de continuar su crecimiento *in vitro*. El progreso de nuestros cultivos fue similar al de otros autores (Kano et al., 1994) que reseñaron la primera adhesión de las células a las 72 horas de cultivo, con un crecimiento posterior continuo hasta confluir en una monocapa completa aproximadamente a los 7 días (Walter, 1995), observándose el movimiento ciliar característico de este epitelio.

En los cultivos celulares primarios, los fibroblastos se dividen más rápido que la mayoría de tipos celulares y en cultivos mixtos tienden a cubrir la población y a camuflar las células de interés (Ouhibi et al., 1991). En nuestro estudio, la inmunotinción de citoqueratinas, los marcadores más ampliamente empleados para diferenciar células epiteliales, confirmó que el cultivo no estaba contaminado de forma importante por otros tipos celulares y que éste era epitelial en su origen. Más del 95 % de las células aisladas resultaron positivas a la tinción, proporción similar a la alcanzada por otros investigadores en la especie bovina (Thibodeaux et al., 1992; Walter, 1995; Reischl et al., 1999).

Las células POEC utilizadas por otros autores como Nagai y Moor (1990) o Kano et al. (1994) se cultivaron siguiendo una técnica muy similar a la empleada en este trabajo experimental. Sin embargo, hasta ahora, se desconocía si los efectos encontrados por los diferentes autores se debían realmente a la acción de las células epiteliales ya que en estos estudios no se realizaron pruebas inmunocitoquímicas. El hecho de que nuestro estudio revele que un elevado porcentaje se corresponda con células de tipo epitelial sugiere que los efectos que las monocapas de POEC utilizadas en este trabajo puedan tener sobre los distintos parámetros valorados se deben, con toda probabilidad, a células epiteliales del oviducto. Estos resultados podrían tener una importante aplicación práctica en el laboratorio ya que confirman que las cerdas prepúberes sacrificadas en matadero podrían actuar como donantes de células POEC.

Sin embargo, como se ha sugerido, la funcionalidad de estas células está regulada por los patrones hormonales a lo largo del ciclo estral y, en nuestro caso, los cultivos no fueron tratados con esteroides. Por tanto, los patrones fisiológicos de nuestras células epiteliales pueden no haber sido los mismos que los que tienen lugar *in vivo* ya que la secreción de determinadas glicoproteínas, con acción directa sobre la ZP o la reacción de zona y mediadas por los niveles estrógeno/progesterona, puede no haberse producido bajo nuestras condiciones. Tal y como describe Leese (1988), la síntesis del contenido de los gránulos secretores de las células oviductales está controlada por la progesterona y su liberación por el estradiol. Además, existen glicoproteínas oviductales estrógeno dependientes (Buhi et al., 1993). En nuestra opinión, serían deseables estudios comparativos sobre el efecto de células procedentes de cerdas prepúberes y adultas, así como de la actividad de las células *in vitro* bajo el estímulo hormonal adecuado.

Los resultados de la experiencia 2.1 (Tabla 6) nos demuestran que con el sistema de FIV elegido, los porcentajes medios de penetración son muy elevados, situándose en todos los grupos por encima del 80 % y que la variabilidad entre los replicados fue baja (Tabla 6.1).

Si analizamos las variables estudiadas, observamos que el hecho de preincubar los ovocitos con células oviductales 3 horas antes de la FIV no parece afectar a los parámetros de fecundación (Tabla 6). Las posibles explicaciones de estos resultados podrían ser que el tiempo de preincubación es insuficiente para producir ningún tipo de cambio en el ovocito (unión de glicoproteínas oviductales por ejemplo), que el sistema de FIV empleado no permite discriminar este efecto (debido a un elevado *ratio* espermatozoides/ovocito) o bien que el cultivo de POEC empleado no fue “funcional” o “activo”. En nuestra opinión, cualquiera de las tres hipótesis podría ser válida. Con respecto a la primera se ha reseñado un efecto beneficioso sobre la monospermia de la preincubación de ovocitos porcinos con POEC (Romar et al., 2001) o con glicoproteínas porcinas purificadas (Kouba et al., 2000), oscilando el tiempo de contacto en ambos estudios entre 2 y 4 horas antes de la FIV y empleándose en ambos casos espermatozoides eyaculados. En cuanto al elevado número de espermatozoides utilizado, ya ha sido sugerido por algunos autores que el efecto de las células oviductales desaparece o se enmascara cuando se emplean concentraciones espermáticas elevadas (Dubuc y Sirard, 1995; Romar et al., 2001). Por último, en cuanto a la posible funcionalidad del cultivo, según un estudio de Dubuc y Sirard (1996) el tratamiento con estradiol de vesículas oviductales procedentes del

istmo, incrementaría los porcentajes de monospermia frente a las no tratadas o las tratadas con progesterona.

Igualmente, pudiera ser que el tiempo de contacto ovocito-célula oviductal oscilara dependiendo del tipo de cultivo (monocapas, vesículas,...), momento del ciclo estral, región oviductal, etc. pero siempre teniendo en cuenta el grado de actividad del mismo. En cualquier caso, el tiempo de contacto previo a la fecundación siempre ha de ser relativamente corto para evitar un envejecimiento del ovocito ya que en condiciones *in vivo* los ovocitos porcinos comienzan a degenerar a las 6-8 horas postovulación (Hunter, 1982), por lo que estos tiempos de contacto entre células oviductales y ovocito no deberían sobrepasarse tampoco en condiciones *in vitro*.

En este estudio no se observó un efecto de la preincubación ovocitaria sobre el porcentaje de formación de PNM lo que coincide con las observaciones de otros autores que han preincubado ovocitos (Kouba et al., 2000; Romar et al., 2001). Estos datos confirmarían el buen desarrollo citoplasmático alcanzado con los medios y suplementos de MIV empleados, concretamente en nuestras experiencias con el medio NCSU-37.

En cuanto al efecto de las células del cúmulus, tal como se ha indicado que ocurre en otros estudios con espermatozoides crioconservados, éstas ejercen un efecto positivo sobre la penetrabilidad (Kikuchi et al., 1993; Wang et al., 1994, 1995) favoreciendo en nuestro estudio la entrada de un mayor número de espermatozoides al ovocito. El efecto de las células del cúmulus favoreciendo la reacción acrosómica ha sido referido por numerosos investigadores en distintas especies (Mattioli et al., (1988a; Kikuchi et al., 1993; Chian et al., 1995) lo que en nuestras condiciones pudo haber sido la razón del incremento de penetrabilidad de los ovocitos con cúmulus frente a los desnudos. Existen distintas opiniones sobre la forma de actuar de estas células. Por un lado, el cúmulus actuaría como una matriz que atrapa los espermatozoides favoreciendo su posterior capacitación y reacción acrosómica. Así, Wang et al. (1991) observaron que, aunque efectivamente existe una reducción de la motilidad en los espermatozoides congelados-descongelados, aquellos que penetran la masa del cúmulus antes de la pérdida completa de la movilidad pueden mantener su capacidad para sufrir la capacitación y posteriormente penetrar el ovocito. Por otro lado, el cúmulus podría actuar como una barrera mecánica que el espermatozoide ha de atravesar. En este sentido, se ha sugerido que un número excesivo de células del cúmulus rodeando al ovocito durante la fecundación podría decrecer la penetrabilidad (Kikuchi et al., 1993). Aunque ambos mecanismos de acción pueden ser igualmente válidos, de nuestros resultados se infiere que el primero predominó sobre el segundo.

Por otra parte, los resultados de la tabla 6 también indican un efecto del cúmulus sobre la monospermia, en este caso influyendo negativamente sobre la misma (43'48 vs. 6'41) e igualmente sólo para los ovocitos no preincubados. Estos resultados son lógicos si, como acabamos de mencionar, entre las funciones del cúmulus está la de favorecer la reacción acrosómica aumentando así el número de espermatozoides por ovocito penetrado y nos demuestran que, en nuestro sistema, estas células son funcionalmente activas. Sin embargo, estas observaciones resultan contradictorias con las presentadas por Suzuki et al. (2000) que encontraron el mismo número de espermatozoides en el interior de los ovocitos desnudos y los rodeados por su cúmulus. Probablemente con menores *ratios* espermatozoides/ovocito la penetración se convertiría en un parámetro más crítico y la presencia del cúmulus sería más necesaria para la penetrabilidad de lo que parece en nuestro caso.

Debemos reseñar que los ovocitos preincubados en POEC antes de la FIV mostraron en este caso porcentajes de penetración similares independientemente de la presencia o ausencia de células del cúmulus (93'51 vs. 92'22, Tabla 6). En este caso pudiera ser que se produjera algún tipo de interacción entre ambos tipos celulares que tienda a igualar tanto los porcentajes de penetración como los de monospermia, independientemente de la presencia o ausencia del cúmulus. Si estas interacciones significativas sobre la penetración y la monospermia ($p=0'022$ y $p=0'010$, respectivamente) se deben al hecho de que ambos tipos de ovocitos han estado influenciados por las células oviductales durante 3 horas, nos indicaría que se ha producido algún tipo de alteración o cambio sobre los mismos durante este tiempo. Probablemente estas modificaciones serían a nivel de ZP durante la preincubación, con lo que volviendo a las tres hipótesis planteadas anteriormente, la preincubación durante 3 horas sí pudo afectar de algún modo a los ovocitos de nuestro estudio, aunque no seamos capaces de saber exactamente a qué nivel y, probablemente, no sean los mismos que se observan bajo condiciones *in vivo*.

Con relación a los resultados del CE (Tabla 7), debemos indicar que, al igual que opinan otros autores (Ayoub y Hunter, 1993; Wang et al., 1999), consideramos que el parámetro de porcentaje de división no valora de forma objetiva el sistema de CE, ya que incluso para un técnico experimentado resulta difícil distinguir con una simple visualización en un estereomicroscopio los embriones realmente divididos de los fragmentados o partenogénéticos, que en muchas ocasiones presentan una morfología idéntica. Wang et al. (1999) observaron en embriones porcinos procedentes de MIV/FIV que un 27% de los embriones de 2 células, un 74% de los de 3 células y un 51% de los de 4 células presentaban algún tipo de anomalía morfológica (fragmentación, ausencia de núcleo en uno o más blastómeros o

binucleación). Por tanto, preferimos discutir el valor de otros parámetros para obtener conclusiones de nuestros resultados.

El análisis del porcentaje de blastocistos nos indica, como consecuencia lógica del porcentaje de monospermia, que el grupo de ovocitos no preincubados en POEC y desnudos fue el de mayor rendimiento, aunque la calidad de estos embriones valorada como el número medio de células/blastocisto no fue diferente entre los distintos grupos. En este último parámetro puede sorprender el bajo número de células observado tras la tinción. Como se ha reseñado en la metodología, la selección de los blastocistos se realizó siguiendo consideraciones morfológicas y embriones con aspecto de blastocisto alcanzaron un bajo número de núcleos lo que podría explicarse por la presencia de embriones fragmentados y/o blastómeros anucleados. En cualquier caso, se ha observado que los embriones producidos *in vitro* tienen un bajo número de células (Wang et al., 1999) y el número de blastómeros en este estudio está dentro del rango de los alcanzados por el laboratorio donde se realizaron estas experiencias (Rath et al., 1995, 1999). Por último, destacar que al observar el porcentaje de blastocistos tras el CE nos encontramos nuevamente con una posible interacción cúmulus-POEC ($p=0'078$) siendo similares los valores alcanzados por los ovocitos preincubados (17'45 vs. 17'07, Tabla 7) independientemente de la presencia o ausencia de cúmulus.

Por lo que se refiere al efecto de las células oviductales cuando están presentes durante la FIV (experiencia 2.2) observamos un aumento general de la penetrabilidad de los ovocitos fecundados en presencia de POEC (Tabla 8). Concretamente con un significativo aumento del porcentaje de penetración ($p=0'010$) y el número medio de espermatozoides por ovocito ($p<0'001$). Estos mismos resultados se han observado en trabajos anteriores empleando espermatozoides eyaculados refrigerados (Nagai y Moor, 1990; Kano et al., 1994) y crioconservados (Park y Sirard, 1996; Romar et al., 2001), pero los aquí presentados son los primeros empleando espermatozoides de epidídimo. En nuestro estudio, este resultado se podría interpretar como un efecto de las células oviductales sobre los espermatozoides ya que en esta experiencia, a diferencia de la anterior, las monocapas estuvieron presentes durante las 18-20 horas de contacto entre los gametos. En consecuencia, a pesar de que las POEC cultivadas *in vitro* en nuestro sistema no realicen, probablemente, todas las funciones que desarrollan *in vivo* sobre el ovocito, sí parecen ser efectivas en su interacción con los espermatozoides epididimarios favoreciendo la capacitación espermática. Estos datos coinciden con los presentados por Fazeli et al. (1999) que observaron una inducción de la capacitación espermática, por parte de las células

oviductales, en espermatozoides eyaculados de verraco y corroborarían el modelo propuesto por Hunter para la capacitación *in vivo* en porcino y otras especies (Hunter 1980; Hunter, 2001). Igualmente, se ha observado en carnero que el contacto espermatozoide-células oviductales aumenta el número de espermatozoides capacitados (Gillan et al., 2000).

La presencia de POEC durante la FIV no tuvo un efecto significativo sobre la formación de PNM (Tabla 8). Estos resultados coinciden con los de otros autores (Nagai y Moor; 1990; Kano et al., 1994), aunque Dubuc y Sirard (1995) sí observaron una mayor formación de PNM al preincubar espermatozoides con células oviductales. En nuestra opinión, la calidad citoplasmática de los ovocitos madurados en medio NCSU-37 es suficiente para alcanzar elevados porcentajes de formación de PNM tras la FIV y éstos no se mejoran por la presencia de células oviductales.

En cuanto al efecto de las células del cúmulus, al igual que en la experiencia anterior aunque quizás no de una forma tan llamativa, se observó un mayor número de espermatozoides en aquellos ovocitos fecundados rodeados por su cúmulus. Concretamente el grupo de ovocitos con cúmulus fecundado en presencia de POEC alcanzó el mayor valor (3'29 espermatozoides) y fue diferente al grupo fecundado en ausencia de ambos tipos celulares (2'12 espermatozoides). Este dato nos volvería a indicar un efecto favorecedor del cúmulus y el oviducto sobre la capacitación espermática y la reacción acrosómica o, en definitiva, sobre la penetrabilidad.

Aunque este estudio no se ha realizado ajustando las condiciones de trabajo para alcanzar la mayor monospermia, ya que ese no era el objetivo, los resultados obtenidos tras la FIV sí podrían utilizarse como un primer precedente sobre el efecto de las células POEC con espermatozoides de epidídimo. Puesto que no existen otras referencias, harían falta futuros estudios empleando unas condiciones más próximas a la monospermia con este tipo de espermatozoides para verificar estos resultados preliminares. Para ello sería necesario un *ratio* espermatozoides/ovocito más ajustado, un tiempo de cocultivo entre gametos reducido e incluso emplear otro medio de FIV con mejores resultados de monospermia como el TBM (Martínez-Madrid et al., 2001).

Nuevamente al observar los resultados de penetrabilidad para cada uno de los replicados de esta experiencia (Tabla 8.1) observamos que éstos no ofrecen una gran variabilidad entre las sesiones de trabajo. Estos datos (junto a los de la tabla 6.1) nos indicarían que los espermatozoides crioconservados de epidídimo son una herramienta útil para estandarizar la FIV porcina. Estas observaciones apoyarían las ofrecidas por Rath y Niemann (1997) que observaron porcentajes de fecundación

consistentes y una mínima variabilidad empleando espermatozoides epididimarios frente a eyaculados, procedentes de los mismos verracos.

Por lo que se refiere a los parámetros de desarrollo embrionario (Tabla 9), la presencia de las células del cúmulus durante la FIV sí tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de división de esta experiencia que, en nuestra opinión, puede conducir a error por la subjetividad de la valoración de este parámetro, como hemos indicado anteriormente. Prueba de ello es el hecho de que el porcentaje de blastocistos no indica ningún efecto del cúmulus y es, sin ninguna duda, una consecuencia del porcentaje de división. Aunque los ovocitos fecundados en presencia de POEC mostraron una tendencia a dividirse más que los fecundados en ausencia de POEC ($p=0'07$) no creemos que este parámetro deba considerarse decisivo. Tampoco se observó un efecto de las células POEC durante la FIV sobre el posterior porcentaje de blastocistos ni el número de blastómeros por embrión.

En consecuencia, con los datos de la tabla 8 creemos que se puede afirmar un aumento de la penetrabilidad cuando las células oviductales están presentes durante la FIV, aunque el hecho de hallarse durante las 18-20 horas de contacto entre los gametos no parece ofrecer un mejor rendimiento embrionario que su ausencia (tanto el grupo POEC NO-Cúmulus NO de esta experiencia como el de la experiencia anterior son los que ofrecen mejores resultados de blastocistos). Esto nos llevaría de nuevo a elucubrar sobre el hecho de que quizás nuestros cultivos no ofrezcan el soporte hormonal adecuado para que las células epiteliales realicen sus funciones o secreten las glicoproteínas necesarias para afectar al ovocito y al embrión en desarrollo.

La ZP de los ovocitos control utilizados en la experiencia 3.1 resistió la digestión con pronasa durante algo más de 6 minutos (400'36 segundos; Tabla 10). Igualmente Kouba et al. (2000) han observado que la ZP del 95 % de los ovocitos desaparece a los 6 minutos de entrar en contacto con una solución de pronasa. Sin embargo, Kim et al. (1996) aportan resultados sensiblemente inferiores, algo más de 1 minuto. En nuestro estudio, tras preincubar los ovocitos 3 horas en POEC (POEC SÍ) o mantenerlos 3 horas más en medio de FIV sin células oviductales (POEC NO) la ZP de los ovocitos de todos los grupos necesitó más tiempo que el control para disolverse. Estos datos coinciden con aquellos autores que han observado un endurecimiento espontáneo de la ZP durante el cultivo de los ovocitos (Gianfortoni y Gulyas, 1985). Sin embargo, el hecho de que los ovocitos rodeados por su cúmulus durante las 3 horas de tratamiento mostraran una tendencia a tener ZP más insolubles ($p=0'060$, Tabla 10) no coincidiría con las observaciones de De Felici y Siracusa

(1982) en ratón, quienes reportaron una disminución del grado de endurecimiento de la ZP en los ovocitos con cúmulus.

Nuestros datos parecen indicar que la ZP sufre un endurecimiento espontáneo durante el cultivo que se revierte con el paso del tiempo, ya que a las 6 horas de tratamiento los valores de todos los grupos fueron inferiores a los de las 3 horas. Sin embargo, tampoco a este tiempo se apreció un efecto significativo de las células oviductales ni del cúmulus. Aunque en ovocitos porcinos madurados *in vivo* se ha referido que las secreciones oviductales endurecen la ZP (Broermann et al., 1989), desconocemos el posible efecto de las células oviductales cultivadas *in vitro* con ovocitos madurados *in vitro*. Kim et al. (1996) sí señalaron un aumento en el tiempo de digestión de la ZP en condiciones *in vitro* pero tras cultivar los ovocitos directamente con fluido oviductal recogido *in vivo*. Bajo nuestras condiciones podría ser que el(los) factor(es) responsables de ese endurecimiento en la ZP no hubieran sido secretados al medio y no estuvieran presentes durante el cultivo, reforzando así nuestra idea de que, aunque los explantes oviductales *in vitro* no sustituyen al tejido oviductal *in vivo*, una estimulación hormonal adecuada podría ayudar a imitar más adecuadamente un microambiente fisiológico.

Una posible hipótesis para explicar el hecho de que no hayamos observado un efecto sobre el endurecimiento de la ZP con ninguno de los dos tipos celulares estudiados podría ser que los tiempos seleccionados no nos permitan determinar el efecto. Otra posible hipótesis sería una falta de sensibilidad de esta prueba para detectar pequeñas modificaciones a nivel de la ZP. En nuestra opinión, son necesarios más estudios al respecto ya que muy recientemente Kouba et al. (2000) tampoco han observado un endurecimiento de la ZP en ovocitos madurados *in vitro* tratados con una glicoproteína porcina purificada. Así pues, aunque existen evidencias de que las glicoproteínas oviductales (oviductinas) se adhieren a la ZP quizás ellas por sí solas no provoquen el endurecimiento de la ZP sino que sean necesarios otro(s) factores oviductales.

En cuanto a los resultados de la digestión de la ZP a las 3 horas de la fecundación (experiencia 3.2, Tabla 11), no se observó que la presencia de células POEC ni del cúmulus durante la FIV ejercieran un efecto significativo sobre la ZP. Los tiempos de digestión en esta experiencia son similares al control (ovocitos justo tras la MIV) pero podemos observar que fueron inferiores a los observados en la experiencia anterior (Tabla 10), en la que los ovocitos no estuvieron en contacto con espermatozoides. De esta observación podríamos sugerir que los espermatozoides

parecen afectar al grado de endurecimiento de la ZP haciéndola más blanda. Una posible explicación a este efecto podría ser que las enzimas acrosomales de los espermatozoides reaccionados modificaran la ZP volviéndola más susceptible de ser digerida. En ovocitos de ratona, el endurecimiento de la ZP es un proceso proteasa-dependiente (Wassarman, 1988b) y sabemos que durante la reacción acrosómica se liberan ciertas proteasas como la acrosina (Yanagimachi, 1994). Estas enzimas podrían ser responsables de modificaciones moleculares y estructurales de la ZP en ovocitos porcinos, tal y como se ha sugerido para otras especies (Hardy y Hedrick, 1989). Otra explicación podría ser que el medio de cultivo varía en sus propiedades fisicoquímicas debido al elevado número de células (1.500 espermatozoides/ovocito y 45-55 ovocitos) en un volumen reducido (200 μ l). Sin embargo estas hipótesis deberían ser analizadas con detenimiento para establecer conclusiones definitivas.

Así pues, en nuestro sistema en conjunto no parece producirse un endurecimiento significativo de la ZP tras la FIV. Esta situación sería contraria a lo que ocurre bajo condiciones *in vivo* (Broermann et al., 1989; Wang et al., 1998) y podría aceptarse como uno de los muchos factores que influyen en la polispermia. Este hecho podría explicarse por las características diferentes que presentan los ovocitos madurados *in vivo* e *in vitro*. Se ha observado que la superficie de la ZP de ovocitos porcinos madurados *in vivo* es sensiblemente diferente a la de los madurados *in vitro*, estos últimos con un menor grosor y un mayor número de pequeñas depresiones u "orificios" (Funahashi et al., 2000). Igualmente, Villamediana et al. (1999) también han señalado diferencias en la ZP de los ovocitos de cabras adultas ovulados y madurados *in vitro*.

Por lo que se refiere al estudio de la densidad y distribución de los GC, la metodología empleada en el presente trabajo nos indicó que el área media ocupada por uno de los puntos fluorescentes observados en el interior de los ovocitos tras la tinción con PNA era de 0'094 μ m², resultando un diámetro de 0'34 μ m. En nuestra opinión, este dato implicaría que el área real de un GC debería ser menor de 0'094 μ m² e igualmente tener un diámetro menor a 0'34 μ m, ya que se asume que la fluorescencia emitida distorsiona la visión exacta de los límites del GC. Aunque el tamaño de los GC es diferente en las distintas especies y es un dato que varía ampliamente de unos autores a otros según la metodología empleada (revisado por Guraya, 1985), estas mediciones no se alejan de las presentadas por Yoshida et al. (1993b). Estos autores refirieron un diámetro de 0'16 μ m tras hacer la media de los tamaños de los GC en 50 ovocitos porcinos madurados *in vitro* y observados por microscopía electrónica, un dato probablemente más preciso que el nuestro. Sería

preferible comparar nuestros resultados con aquellos trabajos que hayan realizado estudios cuantitativos mediante microscopía confocal (Kim et al., 1996; Wang et al., 1997a,b,c) pero, desgraciadamente, en ellos se ha referido la metodología empleada por el equipo de Yoshida sin aportar los propios datos de tamaño de los GC observados.

En nuestro estudio, el recuento del número de puntos fluorescentes en cada una de las zonas delimitadas se realizó de forma computerizada mediante un analizador de imágenes (MIP4) lo que nos asegura una cierta objetividad en las mediciones. Una metodología parecida ha sido empleada en ratón para cuantificar los GC (Ducibella et al., 1994) pero hasta ahora no ha sido empleada en porcino, donde se han contabilizado el número medio de GC de forma visual ampliando la imagen recogida en el microscopio y utilizando un monitor de 16" (Wang et al., 1998). De este modo, las diferencias en la metodología nos proporcionan unos resultados algo sorprendentes en comparación con los ofrecidos hasta ahora. En efecto, en el trabajo de Wang et al. (1997b) el número medio de GC observado en el córtex al final de la MIV fue de 33-67 GC/100 μm^2 , bastante inferior al observado por nosotros (476'31, Tabla 12). En nuestra opinión, aportando los datos del porcentaje de área marcada con PNA-FITC se podría evitar la subjetividad de la medición. Por un lado, obviando el posible error derivado del distinto tamaño de los GC dentro de un mismo ovocito, y por otro evitando los posibles fallos en el recuento debidos a la ampliación de la imagen en la pantalla del ordenador sin una correspondencia exacta con el aumento del tamaño del tamaño del área del ovocito. De este modo se facilitaría y homogeneizaría la comparación de resultados entre distintos equipos de investigación.

Básicamente, los trabajos sobre GC se refieren durante la MIV de los ovocitos, aquellos relativos a ovocitos fecundados son escasos y carecemos de otros en los que los ovocitos han sido fecundados bajo distintas condiciones. Wang et al. (1997b) aportan datos de GC/100 μm^2 en el córtex de ovocitos a las 6, 8, 18 y 24 horas postfecundación bajo las mismas condiciones pero, debido a las diferencias metodológicas argumentadas anteriormente, no resultan comparables a nuestros resultados. La medida de la densidad de gránulos (GC/100 μm^2) puede no ser tan precisa como la del % de área ocupada que nosotros reflejamos aquí, y que podría ayudar en estos casos a facilitar las comparaciones, pero no es utilizada por otros autores. Igualmente creemos que referir las observaciones en los tres planos distintos del ovocito (ecuador, córtex y ZP), y no únicamente a nivel de córtex, podría ayudar a establecer unos valores fisiológicos de GC en la especie porcina y a valorar los cambios que se producen en la distribución de estas organelas durante la fecundación.

Observando más detalladamente la tabla 12, deducimos que la preincubación de los ovocitos 3 horas en POEC no parece afectar a la densidad de los GC (en número/100 μm^2) en ninguna de las 3 zonas estudiadas, aunque sí se observa que las células del cúmulus disminuyen el número de GC en la ZP. Esto nos podría indicar un cierto retraso en la exocitosis que se podría relacionar con la mayor penetrabilidad de los ovocitos con cúmulus, pero son necesarios más estudios para corroborar esta hipótesis ya que este efecto no aparece ni en los ovocitos preincubados 6 horas (Tabla 13) ni en los fecundados en presencia de POEC (Tabla 14).

En la tabla 13 se observa que la interacción entre el cúmulus y el POEC afecta a la densidad de los GC en la ZP y probablemente en el córtex, siendo los grupos de ovocitos preincubados en presencia de algunos de los dos tipos celulares los que alcanzan una mayor densidad de GC en ambas zonas. Esto podría indicar una mayor exocitosis pero no disponemos de datos de FIV que puedan corroborarlo.

Por último, un dato que resulta evidente y, en nuestra opinión, demuestra la correcta aplicación de la técnica de tinción, visualización y recuento es el reflejado en la tabla 14. Aquí observamos en todos los grupos que el número de GC/100 μm^2 de ecuador, córtex o ZP es muy inferior al observado para los ovocitos no fecundados (Tablas 12 y 13). Estos resultados nos indican que quizás los estudios sobre la densidad y distribución de los GC antes y después de la FIV deberían revisarse y ampliarse para determinar los valores normales en las distintas condiciones y decidir, entre otros términos, qué parámetro proporciona una mayor información (ecuador, córtex o ZP; y área o número /100 μm^2). En nuestro caso, como puede observarse en las tablas 12, 13 y 14, el número de GC/100 μm^2 en la ZP fue siempre inferior al observado en el ecuador y éste a su vez inferior al observado en el córtex. Esta secuencia se corresponde con la previsible distribución de los GC en ovocitos maduros.

Los resultados de este trabajo experimental muestran que, efectivamente, existe una reacción cortical con una importante salida de GC al exterior del ovocito por lo que el posible “fallo” en el bloqueo de la monospermia no sería la “no exocitosis”. Además, bajo nuestras condiciones, esta reacción cortical se produciría antes de las 3 horas postfecundación. Quizás el hecho de que exista un número elevado de espermatozoides capacitados y reaccionados provocaría que esa salida de GC fuera insuficiente para bloquear la entrada de espermatozoides adicionales. Este hecho, junto al no endurecimiento de la ZP tras la fecundación, podrían ser algunas de las causas de la polispermia en los sistemas de FIV.

Resumiendo, en nuestra opinión son necesarios nuevos estudios para dilucidar las posibles interacciones que se establecen *in vitro* entre las células oviductales y las del cúmulus. Igualmente, la estimulación hormonal de los cultivos de POEC con una caracterización de las sustancias secretadas arrojaría luz para el entendimiento del efecto que las células oviductales ejercen *in vivo*. Además, estos cultivos celulares tratados hormonalmente podrían introducirse en los sistemas de FIV, a distintos niveles, para lograr un ambiente más fisiológico e imitar de manera más precisa en el laboratorio las condiciones *in vivo*. Finalmente, la realización de trabajos sobre la cinética de la digestión de la ZP o la exocitosis de los GC nos ayudaría a determinar de forma más concreta momentos clave en el proceso de la fecundación *in vitro* que ayudarían a mejorar los sistemas de FIV.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Las células del oviducto de hembras porcinas prepúberes que crecen en los cultivos *in vitro*, según la metodología descrita en nuestro estudio, son mayoritariamente epiteliales.
2. La utilización de espermatozoides epididimarios crioconservados permite obtener una baja variabilidad entre replicados en nuestro sistema de fecundación *in vitro*.
3. La presencia de células epiteliales del oviducto durante la fecundación *in vitro* incrementa la penetrabilidad de los ovocitos porcinos fecundados con espermatozoides epididimarios.
4. La presencia de células del cúmulus aumenta el valor de los parámetros relacionados con la penetrabilidad y disminuye la monospermia en ausencia de células oviductales.
5. Bajo el sistema de fecundación *in vitro* empleado la zona pelúcida no se endurece tras la fecundación como ocurre bajo condiciones *in vivo*.
6. La metodología empleada en nuestro estudio para la valoración de la densidad y distribución de los gránulos corticales es objetiva, fiable y simplifica el análisis de los resultados.
7. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que bajo las condiciones empleadas se produce exocitosis de gránulos corticales, aunque no se observa un bloqueo efectivo de la polispermia.
8. Existen interacciones entre las células epiteliales del oviducto y las células del cúmulus que afectan a algunas variables relacionadas con la fecundación *in vitro* y la densidad de gránulos corticales.

RESUMEN

7. RESUMEN

La investigación sobre el efecto e interacciones *in vitro* de algunos tipos celulares presentes en condiciones fisiológicas durante la fecundación en la especie porcina, como pueden ser las células oviductales o las células del *cumulus oophorus*, podría arrojar alguna luz sobre las causas que provocan las penetraciones polispérmicas *in vitro*. De este modo, el rendimiento de los sistemas actuales de producción *in vitro* de embriones porcinos podría ser mejorado.

El objetivo del presente trabajo consistió en valorar el efecto de las células epiteliales del oviducto porcino (POEC) y del *cumulus oophorus* sobre distintos parámetros relacionados con la fecundación *in vitro* (FIV) en la especie porcina. Las variables estudiadas fueron el porcentaje de penetración, el número medio de espermatozoides por ovocito, el porcentaje de formación de pronúcleo masculino, el porcentaje de monospermia, el porcentaje de cigotos divididos a las 48 horas postfecundación, el porcentaje de blastocistos, el número medio de núcleos por blastocisto, la resistencia de la zona pelúcida (ZP) a la digestión con pronasa y la densidad y distribución de los gránulos corticales (GC) en los diferentes grupos experimentales.

Para conseguir el objetivo propuesto se utilizaron ovocitos porcinos madurados *in vitro*, rodeados o no por sus células del cúmulus y preincubados o fecundados en monocapas de POEC tras valorar la riqueza de los cultivos en células epiteliales. Todas las experiencias se realizaron con espermatozoides de epidídimo crioconservados con la finalidad de evitar al máximo la variabilidad entre ensayos, lo que se confirmó posteriormente en el análisis de los datos.

Los resultados del estudio indican que los cultivos de POEC empleados son de una gran pureza en células epiteliales (por encima del 95%). Estas células, junto a las del cúmulus y la interacción entre ambas, afectan significativamente, bajo nuestras condiciones experimentales, a algunos de los parámetros valorados. La presencia de células POEC durante la FIV y las células del cúmulus aumentaron la penetrabilidad. Además las células del cúmulus disminuyeron la monospermia en ausencia de células oviductales. Sobre el posterior desarrollo embrionario se observó un menor porcentaje de división y de blastocistos en los ovocitos preincubados con POEC antes de la FIV que en los no preincubados. Ni las células POEC ni el cúmulus aumentaron el tiempo de digestión de la ZP, que además no se endureció tras la fecundación, a diferencia de lo que ocurre bajo condiciones *in vivo*. La metodología empleada para la valoración de

la densidad y distribución de los GC se mostró fiable, objetiva y simplificó el análisis de los resultados. Las células del cúmulus parecen disminuir el número de GC en el córtex y la ZP de los ovocitos tratados 3 horas antes de la FIV. Los ovocitos no fecundados mostraron una mayor densidad de GC en el ecuador, córtex y ZP que los ovocitos fecundados.

Estos resultados previos nos permiten suponer que empleando condiciones más próximas a las fisiológicas, como la disminución del *ratio* espermatozoides/ovocito y el empleo de monocapas de POEC cultivadas con el soporte hormonal adecuado, se podrían observar con mayor claridad los efectos de ambos tipos celulares y se obtendrían más datos sobre su posible papel en la obtención de penetraciones monospermicas.

SUMMARY

8. SUMMARY

The research about the effect and *in vitro* interactions of some cellular types which are present under physiological conditions during the fertilisation in the porcine, such as the oviductal cells or the *cumulus oophorus* cells, could throw light on the causes that cause the polyspermic penetrations *in vitro*. As a result, the output of the current systems for *in vitro* embryo production in pigs could be improved.

The aim of this experimental work was to assess the effect of porcine oviductal epithelial cells monolayers (POEC) and cumulus cells on different parameters related to the *in vitro* fertilization (IVF) in pigs. The studied variables were: the rate of penetration, the mean number of spermatozoa per oocyte, the rate of male pronuclear formation, the rate of monospermy, the cleavage rate after 48 hours of fertilisation, the blastocysts rate, the mean number of nuclei per blastocyst, the hardening of the zona pelucida (ZP) and the density and distribution of cortical granuli (GC) in the different experimental groups.

To reach the proposed objective, we used denuded and cumulus-enclosed oocytes preincubated or fertilized with POEC, after the assessment of the pureness in epithelial cells of these cultures. All the experiments were carried out with frozen-thawed epididymal spermatozoa trying to avoid the variability between replicates, as it was subsequently confirmed by the analysis of the data.

The results show that the POEC cultures of this study have a high proportion of epithelial cells (over 95%). Under our experimental conditions, these cells, joined to the cumulus cells and the interactions between them, have a significant effect on some of the studied parameters. The presence of POEC during IVF and the cumulus cells increased the oocyte penetrability. Moreover, cumulus cells in absence of POEC decreased the monospermy rate. On the subsequent embryo culture it was observed a lower cleavage rate and blastocyst formation in the oocytes preincubated with POEC before IVF than in the non preincubated. Neither POEC nor cumulus increased the time of ZP digestion with pronase and the ZP did not show a hardening after IVF, on the contrary as it happens under *in vivo* conditions. The methods employed to assess the number and distribution of GC was reliable, objective and it simplified the analysis of the results. The cumulus cells seem to decrease the number of GC in the cortex and ZP from oocytes treated 3 h before IVF. The non fertilized oocytes showed a higher density of GC in the equator, cortex and ZP than the fertilized oocytes.

These preliminary results let us suppose that using conditions closer to the physiological ones, such as a decrease of the *ratio* spermatozoa/oocyte and employing monolayers of POEC primed with the appropriate hormonal supplement, the effects of both kind of cells could be observed more clearly and we could get more data about their role to obtain monospermic penetrations.

ABREVIATURAS

9. ABREVIATURAS

- BOm:** medio de Bracket y Oliphant
- BSA:** albúmina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin*)
- CE:** cultivo *in vitro* de embriones
- COCs:** complejos células del *cumulus oophorus*-ovocito
- dbAMPc:** dibutilil AMP cíclico
- EGF:** factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*)
- E/O:** número medio de espermatozoides por ovocito penetrado
- FCS:** suero fetal bovino (*Fetal Calf Serum*)
- FIV:** fecundación *in vitro*
- FITC:** isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein Isotiocianate*)
- FO:** fluido oviductal
- GC:** gránulos corticales
- HCG:** gonadotropina coriónica humana (*Human Chorionic Godanotropin*)
- MIV:** maduración *in vitro*
- 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*)
fluoresceína
- PFF:** fluido folicular porcino (*Porcine Follicular Fluid*)
- PMSG:** gonadotropina sérica de yegua gestante (*Pregnant Mare Serum Gonadotropin*)
- PNA:** lectina procedente de *Arachis hypogaeae* (*Peanut Agglutinin*)
- PNA-FITC:** lectina procedente de *Arachis hypogaeae* conjugada a isotiocianato de
- PNM:** pronúcleo masculino
- % PNM:** porcentaje de formación de pronúcleo masculino
- POEC:** células epiteliales de oviducto porcino (*Porcine Oviductal Epithelial Cells*)
- SOF:** fluido oviductal sintético (*Synthetic Oviductal Fluid*)
- TALP:** medio de Tyrodes con albúmina, lactato y piruvato (*Tyrodes Albumin Lactate Pyruvate*)
- TBM:** medio trish tamponado (*Trish Buffered Medium*)
- TCM-199:** medio de cultivo 199 (*Tissue Culture Medium-199*)
- VG:** vesícula germinal
- ZP:** zona pelúcida

BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

Aitken RJ. Tubal and uterine secretions: the possibilities for contraceptive attack. *J Reprod Fertil* **1979**; 55:247-254.

Anderson E y Albertini DF. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in mammalian ovary. *J Cell Biol* **1976**; 71:680-686.

Austin CR. Observations on the penetrations of the sperm into the mammalian egg. *Aus J Sci Res* **1951**; 4:581-596.

Ayoub MA y Hunter AG. Parthenogenetic activation of in vitro matured bovine oocytes. *J Dairy Sci* **1993**; 76:421-429.

Banks WJ. Female reproductive system. En: Williams y Wilkins (eds), *Applied veterinary histology*, Chapter 24. Waverly Press Inc., Baltimore, Estados Unidos, **1981**, pp 494-516.

Barr SH y Oliphant G. Sulfate incorporation into macromolecules produced by cultured oviductal epithelium. *Biol Reprod* **1981**; 24:852-858.

Bavister BD. Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo or in vitro. *Theriogenology* **1988**; 29:143-154.

Beier HM. Oviducal and uterine fluids. *J Reprod Fertil* **1974**; 37:221-237.

Berger T, Turner KO, Meizel S y Hedrick JL. Zona pellucida-induced acrosome reaction in boar sperm. *Biol Reprod* **1989**; 40:525-530.

Biggers JD y Borland RM. Physiological aspects of growth and development of the preimplantation mammalian embryo. *Ann Rev Physiol* **1976**; 38:95-119.

Bize I y Santander G. Epinephrine decreases the potassium requirements of hamster sperm capacitation: furosemide blocks the effect of epinephrine. *J Exp Zool* **1985**; 235:261-267.

Bleil JD y Wassarman PM. Sperm-egg interactions in the mouse. Sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol* **1983**; 95:317-324.

Bleil JD, Greve JM y Wassarman PM. Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Dev Biol* **1988**; 128:376-385.

Boatman DE y Robbins RS. Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. *Biol Reprod* **1991**; 44:806-813.

Borland RM, Hazra S, Biggers JD y Lechene CP. The elemental composition of the environments of the gametes and preimplantation embryo during the initiation of pregnancy. *Biol Reprod* **1977**; 16:147-157.

Boyde A. Stereoscopic images in confocal (tandem scanning) microscopy. *Science* **1985**; 230:1270-1272.

Brackett BG y Mastroianni L. Composition of oviductal fluid. En: Johnson AD y Foley CW (eds), *The oviduct and its functions*. Academic Press, New York, Estados Unidos, **1974**, pp 133-159.

Braden AWH, Austin CR y David HA. The reaction of the zona pellucida to sperm penetration. *Aust J Biol Sci* **1954**; 7:391.

Brinster RL. Nutrition and metabolism of the ovum, zygote and blastocyst. En: Greep RO y Astwood EB (eds), *Handbook of Physiology, section 7, Endocrinology II*. American Physiological Society, Washington DC, Estados Unidos, **1973**, pp 165-185.

Broermann DM, Xie S, Nephew KP y Pope WF. Effects of the oviduct and wheat germ agglutinin on enzymatic digestion of porcine zona pellucidae. *J Anim Sci* **1989**; 67:1324-1329.

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

Brown CR y Cheng WKT. Changes in composition of the porcine zona pellucida during development of the oocyte to the 2- to 4- cell embryo. *J Embryol Exp Morphol* **1986**; 92:183-191.

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

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

Burkman LJ, Overstreet JW y Katz DF. A possible role for potassium and pyruvate in the modulation of sperm motility in the rabbit oviducal isthmus. *J Reprod Fertil* **1984**; 71:367-373.

Bwanga CO. Cryopreservation of boar semen. I: A literature review. *Acta Vet Scand* **1991**; 32:431-453.

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

Campos I, Coy P, Romar R, Ruiz S y Gadea J. Effects of maturational stage, cumulus cells and coincubation of mature and immature cumulus-oocyte complexes on in vitro penetrability of porcine oocytes. *Theriogenology* **2001**; 55:1489-1500.

Carolan C, Lonergan P, Van Langendonck A y Mermillod P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology* **1995**; 43:1115-1128.

Chang MC. Fertilising capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* **1951**; 168: 697-698.

Chang MC. Fertilizability of rabbit ova and the effects of temperature in vitro on their subsequent fertilization and activation in vivo. *J Exp Zool* **1952**; 121:351-381.

Cheng WTK. In vitro fertilization of farm animal oocytes. Tesis, CNAA Cambridge, AFRC Institute of Animal Physiology, Animal Research Station, Reino Unido. **1985**.

Cherr G, Lambert H, Meizel S y Katz D. In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: completion on the zona pellucida and induction by homologous soluble zonae pellucidae. *Dev Biol* **1986**; 114:119-131.

Chian RC, Niwa K y Sirard MA. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes in vitro. *Theriogenology* **1994**; 41:1499-1508.

Chian RC, Okuda K y Niwa K. Influence of cumulus cells on in vitro fertilization of bovine oocytes derived from in vitro maturation. *Anim Reprod Sci* **1995**; 38:37-48.

Chian RC y Sirard MA. Fertilizing ability of bovine spermatozoa cocultured with oviduct epithelial cells. *Biol Reprod* **1995**; 52:156-162.

Clarke RN y Johnson LA. Effect of liquid storage and cryopreservation of boar spermatozoa on acrosomal integrity and the penetration of zona-free hamster ova in vitro. *Gamete Res* **1987**; 16:193-204.

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

Coy P. Fecundación "in vitro" en la especie porcina: influencia de diferentes condiciones de cocultivo. Tesis, Universidad de Murcia, Murcia, España. **1991**.

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

Coy P, Martínez E, Ruiz S, Vázquez JM, Roca J y Gadea J. Environment and medium volume influence in vitro fertilisation of pig oocytes. *Zygote* **1993b**; 1:209-213.

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

Cran DG. Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. *J Reprod Fertil* **1985**; 74:237-245.

Cran DG y Cheng WTK. The cortical reaction in pig oocytes during in vivo and in vitro fertilization. *Gamete Res* **1986**; 13:241-251.

Crosby IM, Osborn JC y Moor RM. Follicle cell regulation of protein synthesis and developmental competence in sheep oocytes. *J Reprod Fertil* **1981**; 62:575-582.

De Felici M y Siracusa G. "Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during in vitro culture. *Gamete Res* **1982**; 6:107-113.

Dekel N y Kraizer PF. Induction in vitro of mucification of rat cumulus oophorus by gonadotrophins and adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* **1978**; 57:1420-1425.

Dobrinsky JR, Johnson LA y Rath D. Development of a culture medium (BEMC-3) for porcine embryos: effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. *Biol Reprod* **1996**; 54:1412-1419.

Dubuc A y Sirard MA. Effect of a co-culture of semen and oviductal cells on the rate of polyspermy in pig in vitro fertilization. *Biol Reprod* **1994**; 50:178.

Dubuc A y Sirard MA. Effect of coculturing spermatozoa with oviductal cells on the incidence of polyspermy in pig in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev* **1995**; 41:360-367.

Dubuc A y Sirard MA. Effects of steroids and oviductal cells, from the different parts of the oviduct, on the incidence of monospermy in porcine in vitro fertilization. *Theriogenology* **1996**; 46:449-459.

Ducibella T. Mammalian egg cortical granules and the cortical reaction. En: Wassarman PM (ed), *Elements of mammalian fertilization*. CRC press, Bacca, **1991**, pp 205-230.

Ducibella T, Duffy P y Buetow J. Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. *Biol Reprod* **1994**; 50:467-473.

Dumont JN y Brummett AR. Egg envelopes in vertebrates. En: Browder LW (ed), *Developmental Biology*, Vol. 1. Plenum Press, New York, Estados Unidos, **1985**, pp 235-288.

Dunbar BS, Wardrip NJ y Hedrick JL. Isolation, physiochemical properties and macromolecular composition of zona pellucida from porcine oocytes. *Biochemistry* **1980**; 19:356-365.

Eddy EM. The spermatozoon. En: Knobil E y Neill JD (eds), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, Estados Unidos, **1988**, pp 27-60.

Edwards RG. Conception in the human female. Academic Press, Londres, Reino Unido, **1980**.

Engle CC, Dunn JS, Hood RO, Williams DJ, Foley CW y Trout HF. Amino acids in sow and rabbit oviduct fluids. *J Anim Sci* **1968**; 27:1786-1794.

Eppig JJ. Gonadotropin stimulation of the expansion of cumulus oophori isolated from mice: general conditions for expansion in vitro. *J Exp Zool* **1979**; 208:111-120.

Ericsson RJ, Cornette JC y Buthala DA. Binding of sex steroids to rabbit sperm. *Acta Endocrinol Copenh* **1967**; 56:424-432.

Fazeli A, Duncan AE, Watson PF y Holt WV. Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol Reprod* **1999**; 60:879-886.

Flechon JE y Hunter RH. Distribution of spermatozoa in the utero-tubal junction and isthmus of pigs, and their relationship with the luminal epithelium after mating: a scanning electron microscope study. *Tissue Cell* **1981**; 13:127-139.

Fraser LR. Ca²⁺ is required for mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. *J Androl* **1982**; 3:412.

Fraser LR. Potassium ions modulate expression of mouse sperm fertilizing ability, acrosome reaction and hyperactivated motility in vitro. *J Reprod Fertil* **1983**; 69:539-553.

Fraser LR. Mechanisms controlling mammalian fertilization. En: Clarke JR (ed), *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, Vol. 6. **1984**, pp 174-225.

Fredricsson B. Histochemistry of the oviduct. En: Hafez ESE y Blandau RJ (eds), *The mammalian oviduct*. University of Chicago Press, Chicago, Estados Unidos. **1969**, pp 311-312.

Funahashi H y Day BN. Effects of different serum supplements in maturation medium on meiotic cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Theriogenology* **1993a**; 39:965-973.

Funahashi H y Day BN. Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* **1993b**; 98:179-185.

Funahashi H y Day BN. Effects of follicular fluid at fertilization in vitro on sperm penetration in pig oocytes. *J Reprod Fertil* **1993c**; 99:97-103.

Funahashi H, Cantley TC y Day BN. Different hormonal requirements of pig oocyte-cumulus complexes during maturation in vitro. *J Reprod Fertil* **1994**; 101:159-165.

Funahashi H y Day BN. Advances in in vitro production of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl* **1997**; 52:271-283.

Funahashi H, Cantley TC y Day BN. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following in vitro fertilization. *Biol Reprod* **1997**; 57:49-53.

Funahashi H, Ekwall H y Rodríguez-Martínez H. Zona reaction in porcine oocytes fertilized in vivo and in vitro as seen with scanning electron microscopy. *Biol Reprod* **2000**; 63:1437-1442.

Funahashi H y Nagai T. Regulation of in vitro penetration of frozen-thawed boar spermatozoa by caffeine and adenosine. *Mol Reprod Dev* **2001**; 58:424-431.

Gabler C, Lauer B, Einspanier A, Schams D y Einspanier R. Detection of mRNA and immunoreactive proteins for acidic and basic fibroblast growth factor and expression of the fibroblast growth factor receptors in the bovine oviduct. *J Reprod Fertil* **1997**; 109:213-221.

Gadea J, Ruiz S, Coy P, Romar R, Campos I, Poto A, Peinado B y Sellés E. Efecto del macho y de la presencia de células epiteliales del oviducto porcino (POEC) sobre los resultados de la fecundación in vitro con semen congelado. 1^{er} Simposio Internacional sobre Tecnologías Aplicadas en Reproducción Animal, Buenos Aires, Argentina, **1998**, pp 128-133.

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

Gandolfi F, Brevini TAL y Moor RM. Effect of oviductal environment on embryonic development. *J Reprod Fertil* **1989**; 38:107-115.

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

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

Gianfortoni JG y Gulyas BJ. The effects of short-term incubation (aging) of mouse oocytes on in vitro fertilization, zona solubility and embryonic development. *Gamete Res* **1985**; 11:59-68.

Gillan L, Evans G y Maxwell WM. The interaction of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa with oviducal epithelial cells in vitro. *Reprod Fertil Dev* **2000**; 12:237-244.

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

Grant SA, Long SE y Parkinson TJ. Fertilizability and structural properties of boar spermatozoa prepared by Percoll gradient centrifugation. *J Reprod Fertil* **1994**; 100:477-483.

Grippio AA, Henault MA, Anderson SH y Killian GJ. Cation concentrations in fluid from the oviduct ampulla and isthmus of cows during the estrous cycle. *J Dairy Sci* **1992**; 75:58-65.

Guraya SS. Biology of ovarian follicles in mammals. Springer Verlag, Berlin, Alemania. **1985**, pp 27-34.

Hafez ESE. Scanning electron microscopy of female reproductive tract. *J Reprod Med* **1972**; 9:119-134.

Hafez ESE. Foliculogénesis, maduración del óvulo y ovulación. En: Hafez ESE (ed), *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. Interamericana•Mc Graw-Hill, México DC, México. **1989**, pp 142-158.

Hamner CE y Williams WL. Composition of rabbit oviduct secretions. *Fertil Steril* **1965**; 16:170.

Handrow RR, First NL y Parrish JJ. Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *J Exp Zool* **1989**; 252:174-182.

Hardy DM y Hedrick JL: Isolation and characterization of oviductin from *Xenopus laevis* pars recta oviduct. *Zool Sci* **1989**; 6:1170.

Harkema W, Harrison RA, Miller NG, Topper EK y Woelders H. Enhanced binding of zona pellucida proteins to the acrosomal region of the intact boar spermatozoa in response to fertilizing conditions: a flow cytometric study. *Biol Reprod* **1998**; 58:421-430.

Harrison RA. Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility. *J Reprod Fertil* **1997**; 52:195-211.

Harper MJK. Gamete and zygote transport. En: Knobil E y Neill JD (eds), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, Estados Unidos, **1988**, pp 103-134.

Hedrick JL y Wardrip NJ. On the macromolecular composition of the zona pellucida from porcine oocytes. *Dev Biol* **1987**; 121:478-488.

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

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

Holmdahl TH y Mastroianni L Jr. Continuous collection of rabbit oviduct secretions at low temperature. *Fertil Steril* **1973**; 16:587-595.

Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* **2000**; 62:3-22.

Huang TTF, Fleming AD y Yanagimachi R. Only acrosome-reacted spermatozoa can bind to and penetrate zona pellucida: a study of the guinea pig. *J Exp Zool* **1981**; 217:287-290.

Hunter RHF. Sperm-egg interactions in the pig: monospermy, extensive polyspermy, and the formation of chromatin aggregates. *J Anat* **1976**; 122:43-59.

Hunter RHF. Mating, sperm transport in the female genital tract, and artificial insemination. En: *Physiology and technology of reproduction in female domestic animals*. Academic Press, Londres, Reino Unido, **1980**, pp 140-144.

Hunter RHF. Técnicas para la maduración in vitro de gametos, la fecundación in vitro, el cultivo de embriones y el almacenamiento a largo plazo. En: Hunter RHF (ed), *Fisiología y tecnología de la reproducción de la hembra de los animales domésticos*, 1ª ed. Acribia, España, **1982**, pp 215-241.

Hunter RHF. Pre-ovulatory arrest and peri-ovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *J Reprod Fertil* **1984**; 72:203-211.

Hunter RHF. Fallopian tube fluid: the physiological medium for fertilization and early embryonic development. En: The Fallopian tubes. Their role in fertility and infertility, Chapter III. Springer-Verlag, Berlin, Alemania, **1988**, pp 30-52.

Hunter RHF y Nichol R. Capacitation potential of the Fallopian tube: a study involving surgical insemination and the subsequent incidence of polyspermy. *Gamete Res* **1988**; 21:255-266.

Hunter RHF. New breeding opportunities with deep cornual insemination: exploiting modern sperm technologies in cattle. *Reprod Domn Anim* **2001**; 36:217-222.

Iritani A, Sato E y Mishikawa Y. Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in sows. *J Anim Sci* **1974**; 39:582-588.

Iwasaki T, Kimura E y Totsukawa K. Studies on a chemically defined medium for in vitro culture of in vitro matured and fertilized porcine oocytes. *Theriogenology* **1999**; 51:709-720.

Ka H-H, Sawai K, Wang W-H, Im K-S y Niwa K. Amino acids in maturation media and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated in vitro. *Biol Reprod* **1997**; 57:1478-1483.

Kano K, Miyano T y Kato S. Effect of oviductal epithelial cells on fertilization of pig oocytes in vitro. *Theriogenology* **1994**; 42:1061-1068.

Kano K, Miyano T y Kato S. Effects of glycosaminoglycans on the development of in vitro-matured and -fertilized porcine oocytes to the blastocyst stage in vitro. *Biol Reprod* **1998**; 58:1226-1232.

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

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

Kim NH, Day BN, Lim J-G, Lee HT y Chung KS. Effects of oviductal fluid and heparin on fertility and characteristics of porcine spermatozoa. *Zygote* **1997**; 5:61-65.

Kim NH, Lee JW, Jun SH, Lee HT y Chung KS. Fertilization of porcine oocytes following intracytoplasmic spermatozoon or isolated sperm head injection. *Mol Reprod Dev* **1998**; 51:436-444.

Kouba AJ, LR Abeydeera, Alvarez IM, Day BN y Buhi WC. Effects of the porcine oviduct-specific glycoprotein on fertilization, polyspermy and embryonic development in vitro. *Biol Reprod* **2000**; 63:242-250.

Labadía A. Bases fisiológicas de la Reproducción en la hembra. En: García A, Castejón F, de la Cruz LF, González J, Murillo MD y Salido G (eds), *Fisiología Veterinaria*, Mc Graw-Hill•Interamericana de España, Madrid, España, **1995**, pp 840-860.

Leese HJ. Studies on the movement of glucose, pyruvate and lactate into the ampulla and isthmus of the rabbit oviduct. *J Exp Physiol* **1983**; 68:89-96.

Leese HJ. The formation and function of oviduct fluid. *J Reprod Fertil* **1988**; 82:843-856.

Lim JM, Kim JH, Okuda K y Niwa K. Effect of the presence of glucose during fertilization and/or culture in a chemically semi-defined medium on the development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Dev* **1993**; 39:237-242.

Lippes J. Analysis of human oviductal fluid for low molecular weight compounds. En: Beller FK y Schumacher GFB (eds), *The biology of the fluids in the female genital tract*. Elsevier, North Holland, Holanda, **1979**, pp 373-387.

Longo FJ. Ultrastructural changes in rabbit eggs aged in vivo. *Biol Reprod* **1974**; 11:22-39.

Maas DHA, Storey BT y Mastroianni L Jr. Oxygen tension in the oviduct of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertil Steril* **1976**; 27:1312-1317.

Maas DHA, Storey BT y Mastroianni L Jr. Hydrogen ion and carbon dioxide content of the oviductal fluid of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertil Steril* **1979**; 28:981-985.

Martínez E, Vázquez JM, Matas C, Gadea J, Alonso MI y Roca J. Oocyte penetration by fresh or stored diluted boar spermatozoa before and after in vitro capacitation treatments. *Biol Reprod* **1996**; 55:134-140.

Martínez-Madrid B, Domínguez E, Alonso C, Díaz C, García P y Sánchez R. Effect of IVF medium and sperm concentration on fertilization parameters. 6th International conference on pig reproduction, Missouri, Columbia, Estados Unidos, **2001**, pp 74.

Martus NS, Verhage HG, Mavrogianis PA y Thibodeaux JK. Enhancement of bovine oocyte fertilization in vitro with a bovine oviductal specific glycoprotein. *J Reprod Fertil* **1998**; 113:323-329.

Mastroianni L Jr y Go KJ. Tubal secretions. En: Beller FK y Schumacher GFB (eds), *The biology of the fluids of the female genital tract*. Elsevier, North Holland, Holanda, **1979**, pp 335-344.

Mattioli M, Galeati G y Seren E. Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. *Gamete Res* **1988a**; 20:177-183.

Mattioli M, Galeati G, Bacci ML y Seren E. Follicular factors influence oocyte fertilizability by modulating the intercellular cooperation between cumulus cells and oocyte. *Gamete Res* **1988b**, 21:223-232.

Mattioli M, Barboni B y Lucidi P. Alternative Ca dependent acrosome reaction triggered by the interaction between expanded cumuli and integrin receptors. 50th International Congress on Animal Reproduction (ICAR), Milán, Italia, **1988c**, pp 572.

Mattioli M, Bacci ML, Galeati G y Seren E. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* **1989**; 31:1201-1207.

Mattioli M. Transduction mechanisms for gonadotrophin-induced oocyte maturation in mammals. *Zygote* **1994**; 2:347-349.

Mattioli M, Lucidi P y Barboni B. Expanded cumuli induce acrosome reaction in boar sperm. *Mol Reprod Dev* **1998**; 51:445-453.

Menezo YJR. Amino constituents of tubal and uterine fluids of the estrous ewe: comparison with blood serum and ram seminal fluid. En: Hafez ESE y Thibault CG (eds), *The biology of spermatozoa*. Karger, Basel, Alemania, **1975**, pp 174-181.

Modlinski JA. The role of the zona pellucida in the development of mouse eggs in vivo. *J Embryol Exp Morphol* **1970**; 23:539.

Moor RM, Mattioli M, Ding J y Nagai T. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil Suppl* **1990**; 40:197-210.

Motlik J, Fulka J y Fléchon JE. Changes in intracellular coupling between oocytes and cumulus cells during maturation in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil* **1986**; 76:31-37.

Murdoch RN y White IG. Studies of the stimulating effect of bicarbonate on the metabolism of ram spermatozoa. *J Reprod Fertil* **1971**; 25:231-242.

Myles DG, Hyatt H y Primakoff P. Binding of both acrosome-intact and acrosome-reacted guinea pig sperm to the zona pellucida during in vitro fertilization. *Dev Biol* **1987**; 121:559-567.

Myles DG y Primakoff P. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol Reprod* **1997**; 56:320-327.

Nagai T, Niwa K y Iritani A. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes. *J Reprod Fertil* **1984**; 70:271-275.

Nagai T, Takahashi T, Masuda H, Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S y Hanada A. In vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *J Reprod Fertil* **1988**, 84:585-591.

Nagai T y Moor RM. Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized in vitro. *Mol Reprod Dev* **1990**; 26:377-382.

Nagai T. Current status and perspectives in IVM-IVF of porcine oocytes. *Theriogenology* **1994**; 41:73-78.

Naito K, Fukuda Y y Toyoda Y. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro. *Gamete Res* **1988**; 21:289-295.

Neill JM y Olds-Clarke P. A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. *Gamete Res* **1987**; 18:121-140.

Ng FL, Liu DY y Baker HW. Comparison of Percoll, mini-Percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. *Hum Reprod* **1992**; 7:261-266.

Nichol R, Hunter RHF y Cooke GM. Oviduct fluid pH in intact and unilaterally ovariectomized pigs. *Can J Physiol Pharmacol* **1997**; 75:1069-1074.

Niwa K y Ohgoda O. Synergistic effect of caffeine and heparin on in vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology* **1988**; 30:733-741.

Niwa KJ. Effectiveness of in vitro maturation and in vitro fertilization techniques in pigs. *J Reprod Fertil Suppl* **1993**; 48:49-59.

Okada A, Yanagimachi R y Yanagimachi H. Development of a cortical granule-free area of cortex and the perivitelline space in the hamster oocyte during maturation and following fertilization. *J Submicrosc Cytol* **1986**; 18:233-247.

Oliphant G, Bowling A, Eng LA, Keen S y Randall PA. The permeability of the rabbit oviduct to proteins present in the serum. *Biol Reprod* **1978**; 18:516-520.

Oliphant G, Reynolds AB y Thomas TS. Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Amer J Anat* **1985**; 174:269-283.

Ouhibi N, Menezo Y, Benet G y Nicollet B. Culture of epithelial cells derived from the oviduct of different species. *Hum Reprod* **1989**; 4:229-235.

Ouhibi N, Benet G y Menezo Y. Fetal bovine oviduct epithelial cell monolayers: method of culture and identification. *J Tiss Cult Meth* **1991**; 13:289-294.

Park CK y Sirard MA. The effect of preincubation of frozen-thawed spermatozoa with oviductal cells on the in vitro penetration of porcine oocytes. *Theriogenology* **1996**; 46:1181-1189.

Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA y First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* **1988**; 38:1171-1180.

Pavlok A. Penetration of hamster and pig zona-free eggs by boar ejaculated spermatozoa preincubated in vitro. *Int J Fertil* **1981**; 26:101-106.

Petters RM y Wells KD. Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl* **1993**; 48:61-73.

Pollard JW, Plante C, King W, Hansen PJ, Betteridge KJ y Suarez SS. Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding of oviductal epithelial cells. *Biol Reprod* **1991**; 44:102-107.

Rath D. Experiments to improve in vitro fertilization techniques for in vivo-matured porcine oocytes. *Theriogenology* **1992**; 37:885-896.

Rath D, Niemann H y Torres CRL. In vitro development to blastocysts of early porcine embryos produced in vivo or in vitro. *Theriogenology* **1995**; 547:785-793.

Rath D y Niemann H. In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology* **1997**; 47:785-793.

Rath D, Long CR, Dobrinsky JR, Welch GR, Schreier LL y Johnson LA. In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high speed sorting of X-Chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *J Anim Sci* **1999**; 77:3346-3352.

Reischl J, Prella K, Schöl H, Neumüller C, Einspanier R, Sinowatz F y Wolf E. Factors affecting proliferation and dedifferentiation of primary bovine oviduct epithelial cells in vitro. *Cell Tissue Res* **1999**; 296:371-383.

Restall BJ y Wales RG. The fallopian tube of the sheep. III. The chemical composition of the fluid from the fallopian tube. *Aust J Biol Sci* **1966**; 19: 687-698.

Rizzino A. Defining the roles of growth factors during early mammalian development. En: Bavister BD (ed), *The mammalian preimplantation embryos-regulation of the growth and differentiation in vitro*. Plenum Press, New York, Estados Unidos, **1987**, pp 151-174.

Robitalle G, St-Jacques S, Potier M y Bleau G. Characterization of an oviductal glycoprotein associated with the ovulated hamster oocyte. *Biol Reprod* **1988**; 38:687-694.

Rodríguez-Martínez H, Pertoft H y Johansson M. Cryo-scanning electron microscopy of the porcine oviduct and immunocytochemical localization of hyaluronan in the endosalpinx. *Theriogenology* **1998**; 49:335.

Rogers BJ y Yanagimachi R. Retardation of guinea pig sperm acrosome reaction by glucose: the possible importance of pyruvate and lactate metabolism in capacitation and the acrosome reaction. *Biol Reprod* **1975**; 13:568-577.

Rogers BJ y Yanagimachi R. Competitive effect of magnesium on the calcium dependent acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Biol Reprod* **1976**; 15:614-619.

Roh S, Cha KH, Lee LH, Lee BC y Hwang WS. Effects of oviduct epithelial cells on ability of sperm binding and maintaining motility in vitro. *Theriogenology* **1998**; 49:336.

Romar R, Coy P, Campos I, Gadea J y Ruiz S. Análisis de la concentración de diferentes cationes en el fluido oviductal porcino. 1^{er} Congreso Ibérico de Reproducción Animal, Estoril, Portugal, **1997**, pp 107-108.

Romar R, Coy P, Campos I, Gadea J, Matás C y Ruiz S. Effect of co-culture of porcine sperm and oocytes with porcine oviductal epithelial cells on in vitro fertilization. *Anim Reprod Sci* **2001**; 68:85-98.

Rowan D y Goode L. Nitrogen, dry matter and inorganic constituents in ewe oviduct fluid. *J Anim Sci* **1967**; 25:465.

Rousseau P, Meda P, Lecart C, Haumont S y Ferin J. Cortical granule release in human follicular oocytes. *Biol Reprod* **1977**; 16:104-111.

Rüsse I y Leibich HG. Maturation of secretory granules in the endosalpinx one to four days post coitum in sheep. *Cell Tissue Res* **1979**; 201:145-158.

Sacco AG, Subramanian MG y Yurewicz EC. Association of sperm receptor activity with a purified pig zone antigen (PPZA). *J Reprod Immunol* **1984**; 6:89.

Saeki K, Nagao Y, Hoshi M y Kainuma H. Effects of cumulus cells on sperm penetration of bovine oocytes in protein-free medium. *Theriogenology* **1994**; 42:1115-1123.

Saling PM, Storey BT y Wolf DP. Calcium-dependent binding of mouse epididymal spermatozoa to the zona pellucida. *Dev Biol* **1978**; 65:515-525.

Sathananthan AH y Trounson AO. Ultrastructure of cortical granule release and zona interaction in monospermic and polyspermic human ova fertilized in vitro. *Gamete Res* **1982**; 6:225-234.

Sirard MA, Dubuc A, Bolamba D, Zeng Y y Coenen K. Follicle-oocyte-sperm interactions in vivo and in vitro in pigs. *J Reprod Fertil Suppl* **1993**; 48:3-16.

Schultz RM. Meiotic maturation on mammalian oocytes. En: Wassarman PM (ed), Elements of mammalian fertilization. CRC Press, Boston, Estados Unidos, **1991**, pp 77-104.

Stambaugh R, Noriega C y Mastroianni L Jr. Bicarbonate ion; the corona cell dispersing factor of rabbit tubal fluid. J Reprod Fertil **1969**; 18:51-58.

Stock CE y Fraser LR. Divalent cations, capacitation and the acrosome reaction in human spermatozoa. J Reprod Fertil **1989**; 87:463-478.

Suarez SS, Redfern K, Raynor P, Martin F y Phillips DM. Attachment of boar spermatozoa to mucosal explants of oviduct in vitro: possible role in formation of a sperm reservoir. Biol Reprod **1991**; 44:998-1004.

Suarez SS. The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. Biol Reprod **1998**; 58:1105-1107.

Suzuki K, Mori T y Shimizu H. In vitro fertilization of porcine oocytes in chemically defined medium. Theriogenology **1994**; 42:1357-1368.

Suzuki K, Eriksson B, Shimizu H, Nagai T y Rodríguez-Martínez H. Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized in vitro. Int J Androl **2000**; 23:13-21.

Takahashi Y y First NL. In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. Theriogenology **1990**; 33:335.

Takagi Y, Mori K, Tomizawa M, Takahashi T, Sugawara S y Masaki J. Development of bovine oocytes matured, fertilized and cultured in a serum-free, chemically defined medium. Theriogenology **1991**; 35:1197-1207.

Tantasuparak W, Techakumphu M y Srianan W. The effect of sperm preparation on in vitro fertilization in the pig. Theriogenology **1997**; 47:261.

Techakumphu M y Srianan W. Can oviductal epithelial cells suspension support in vitro development of pig embryos?. 13th IPVS Congress, Bangkok, Tailandia, **1994**, pp 412.

Tervit HR, Whittingham DG y Rowson LEA. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. J Reprod Fertil **1972**; 30:493-497.

Thibault C, Szöllosi D y Gerard M. Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Develop* **1987**; 27:856-896.

Thibodeaux JK, Myers MW, Goodeaux LL, Menezo Y, Roussel JD, Broussard JR y Godke RA. Evaluating an in vitro culture system of bovine uterine and oviduct epithelial cells for subsequent embryo co-culture. *Reprod Fertil Dev* **1992**; 4:573-583.

Töpfer-Petersen E, Calvete JJ, Dostálová ZZ, Reinert M, Waberski D, Sanz L y Hübner T. One year in the life of the spermadhesin family. *Fertilität* **1995**; 11:233-241.

Töpfer-Petersen E, Petrounkina AM y Ekhlasi-Hundrieser M. Oocyte-sperm interactions. *Anim Reprod Sci* **2000**; 60-61:653-662.

Van Winkle LJ, Campione A L y Kester SE. A possible effect of the Na⁺ concentration in oviductal fluid on amino acid uptake by cleavage-stage mouse embryos. *J Exp Zool* **1985**; 235:141-145.

Vatzias G y Hagen DR. Effects of porcine follicular fluid and oviduct-conditioned media on maturation and fertilization of porcine oocytes in vitro. *Biol Reprod* **1999**; 60:42-48.

Verhage HG, Bareither ML, Jaffe RC y Akbar M. Cyclic changes in ciliation, secretion and cell height of the oviductal epithelium in women. *Amer J Anat* **1979**; 156:505-522.

Villamediana P, Ruttlant J, López-Béjar MA, Vidal F y Paramio MT. Changes in zona pellucida surface after in vivo and in vitro maturation of caprine oocytes. *Reprod Dom Anim* **1999**; 34:417-421.

Walker SK, Lampe RJ y Seamark RF. Culture of sheep zygotes in synthetic oviduct fluid medium with different concentrations of sodium bicarbonate and HEPES. *Theriogenology* **1989**; 32:797-804.

Wall RJ, Hyman P, Kerr D, Pintado B y Wells K. Transgenic animal technology. *J Androl* **1997**; 18:236-239.

Walter I. Culture of bovine oviduct epithelial cells (BOEC). *Anat Rec* **1995**; 243:347-356.

Wang WH, Niwa K y Okuda K. In-vitro penetration of pig oocytes matured in culture by frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *J Reprod Fertil* **1991**; 93:491-496.

Wang WH, Uchida M y Niwa K. Effects of follicle cells on in vitro penetration of pig oocytes by cryopreserved ejaculated spermatozoa. *J Reprod Dev* **1992**; 38:125-131.

Wang WH, Abeydeera LR, Okuda K y Niwa K. Penetration of porcine oocytes during maturation in vitro by cryopreserved ejaculated spermatozoa. *Biol Reprod* **1994**; 50:510-515.

Wang WH, Abeydeera LR, Fraser LR y Niwa K. Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and in vitro fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J Reprod Fertil* **1995**; 104:305-313.

Wang WH, Abeydeera LR, Cantley TC y Day BN. Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by in vitro fertilization. *J Reprod Fertil* **1997a**; 111:101-108.

Wang WH, Hosoe M y Shioya Y. Induction of cortical granule exocytosis of pig oocytes by spermatozoa during meiotic maturation. *J Reprod Fertil* **1997b**; 109:247-255.

Wang WH, Sun QY, Hosoe M, Shioya Y y Day BN. Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biol Reprod* **1997c**; 56:1376-1382.

Wang WH, Abeydeera LR, Prather RS y Day BN. Morphologic comparison of ovulated and in vitro-matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev* **1998**; 49:308-316.

Wang WH, Abeydeera LR, Han Y-H, Prather RS y Day BN. Morphologic evaluation and actin filament distribution in porcine embryos produced in vitro and in vivo. *Biol Reprod* **1999**, 60:1020-1028.

Wassarman PM. The mammalian ovum. En: Knobil E y Neill J (eds), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, Estados Unidos, **1988a**, pp 69-107.

Wassarman PM. Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem* **1988b**; 57:415-442.

Wassarman PM, Chen J, Cohen N, Litscher E, Liu C, Qi H y Williams Z. Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. *J Exp Zool* **1999**; 285:251-258.

Watson PF. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod Dom Anim* **1996**; 31:135-140.

Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* **2000**; 60-61:481-492.

Westendorf P, Richter L y Treu H. Deep freezing of boar semen. Laboratory findings and insemination results with the "Hulsenberger Pailletten" technique. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* **1975**; 82:261-267.

Wiseman DL, Henricks DM, Eberhardt DM y Bridges WC. Identification and content of insulin-like growth factors in porcine oviductal fluid. *Biol Reprod* **1992**; 47:126-132.

Woolenhaupt K, Tiemann U, Einspanier R, Schneider F, Kanitz W y Brüssow K-P. Characterization of the epidermal growth factor receptor in pig oviduct and endometrium. *J Reprod Fertil* **1997**; 111:173-181.

Xia P, Rutledge J y Armstrong DT. Expression of glycine cleavage system and effect of glycine on in vitro maturation, fertilization and early embryonic development in pigs. *Anim Reprod Sci* **1995**; 38:155-165.

Yanagimachi R. Calcium requirement for sperm-egg fusion in mammals. *Biol Reprod* **1978**; 19:949-958.

Yanagimachi R. Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization-related phenomena. *Gamete Res* **1982**; 5:323.

Yanagimachi R. Mammalian fertilization. En: Knobil E y Neill JD (eds), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, Estados Unidos, **1988**, pp 135-185.

Yanagimachi R. Mammalian fertilization. En: Knobil E y Neill JD (eds), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, Estados Unidos; **1994**, pp 189-317.

Yoshida M, Ishizaki Y y Kawagishi K. Blastocyst formation by pig embryos resulting from in-vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *J Reprod Fertil* **1990**; 88:1-8.

Yoshida M, Ishigaki K y Pursel VG. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured in vitro. *Mol Reprod Dev* **1992**; 31:68-71.

Yoshida M, Mizoguchi Y, Ishigaki K, Kojima T y Nagai T. Birth of piglets derived from in vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology* **1993a**; 39:1303-1311.

Yoshida M, Cran DG y Pursel VG. Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. *Mol Reprod Dev* **1993b**; 36:462-468.

Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M y Pursel VG. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol Reprod* **1993c**; 49:89-94.

Yoshimatsu N y Yanagimachi R. Effects of cations and other medium components of the zona-induced acrosome reaction of hamster spermatozoa. *Dev Growth Differ* **1988**; 30:641.

Zamboni L. Ultrastructure of mammalian oocytes and ova. *Biol Reprod* **1970**; 2:44-63.

Zheng YS y Sirard MA. The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on in vitro maturation and fertilization of porcine oocytes. *Theriogenology* **1992**; 37:779-790.

Zheng YS, Fiser P y Sirard MA. The use of ejaculated boar semen after freezing in 2 or 6% glycerol for in vitro fertilization of porcine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* **1992**; 38:1065-1075.