

---

# MATERIAL Y MÉTODOS

## **3.1 MEDIOS DE LAVADO Y MANIPULACIÓN GAMETOS**

*3.1.1 Transporte y lavado de ovarios*

*3.1.2 Dilución y lavado espermatozoides*

## **3.2 MEDIOS DE CULTIVO Y SUPLEMENTOS**

## **3.3 MADURACIÓN IN VITRO (MIV)**

## **3.4 VALORACIÓN DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE GSH**

## **3.5 PROCESADO DE LOS ESPERMATOZOIDES**

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

## **3.7 CULTIVO DE EMBRIONES**

## **3.8 VALORACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS RESULTADOS**

*3.8.1 Valoración del estadio nuclear*

*3.8.2 Valoración de la formación pronuclear*

*3.8.2 Valoración del desarrollo embrionario*

## **3.9 TRANSFERENCIA DE EMBRIONES**

*3.9.1 Transporte de los cigotos*

*3.9.2 Anestesia*

*3.9.3 Apertura de la cavidad abdominal*

*3.9.4 Cierre de la cavidad abdominal*

*3.9.5 Diagnóstico de gestación*

## **3.10 DISEÑO EXPERIMENTAL**

## **3.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

En este apartado se describirá 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).

## **3.1 MEDIOS DE LAVADO Y MANIPULACIÓN DE GAMETOS**

### **3.1.1 TRANSPORTE Y LAVADO DE OVARIOS Y OVOCITOS.**

Los medios utilizados para el transporte y lavado de los ovarios, así como para la obtención de los ovocitos fueron los siguientes:

- **Solución Salina** (SS): 0.9% w/v de NaCl con 100 mg/l de sulfato de kanamicina.

- **Solución de cetrimida** (Bromuro de hexadecil-trimetilamonio: Cetab) al 0.04% (w/v).

Ambas soluciones fueron preparadas con agua purificada (Mili-RX) y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su uso en el lavado y recogida de ovarios.

- **Tampón Fosfato Salino de Dulbecco modificado (PBS)** suplementado con 1mg/ml de alcohol polivinílico y 0.005mg/l de rojo fenol como indicador de pH. Este medio se conservó a 4°C hasta su utilización en la manipulación y lavado de los ovocitos recién recolectados.

El medio utilizado para el lavado de los ovocitos maduros, y durante la inyección fue **PBS suplementado** con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FCS; Biological Industries®, Haemek, Israel).

### 3.1.2 DILUCIÓN Y LAVADO DE ESPERMATOZOIDES.

El medio utilizado para la dilución y lavado de los espermatozoides fue el *Beltville Thawing Solution* (BTS) (tabla 1):

Tabla 1. Diluyente BTS para espermatozoides de verraco (Pursel y Johnson, 1975).

Componente	Concentración (mM)
Glucosa	0.0002
Na <sub>2</sub> -EDTA•2H <sub>2</sub> O	3.36
CO <sub>3</sub> HNa	15
Citrato-Na <sub>3</sub> •2H <sub>2</sub> O	20
CIK	5

En la preparación de los espermatozoides para la ICSI, el medio utilizado fue el PBS suplementado.

### 3.2 MEDIOS DE CULTIVO Y SUPLEMENTOS

Los medios para la maduración *in vitro* de ovocitos (MIV), cultivo posterior a ICSI y cultivo *in vitro* de embriones (CE) se detallan a continuación:

Medio **NCSU-37 stock** . 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  $\mu\text{m}$  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,  $\beta$ -mercaptoetanol, insulina, dibutiril 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.* (1997a) y como se refleja en la tabla 3.

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

Componente	Concentración (mM)
<b>NaCl</b>	108.73
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	25.07
<b>KCl</b>	4.78
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1.19
<b>MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O</b>	1.19
<b>CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O</b>	1.70
<b>Glucosa</b>	5.55
<b>D-Sorbitol</b>	12.00
<b>Penicilina G sódica</b>	0.18
<b>Sulfato de estreptomicina</b>	39.00 UI/ml

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

Componente	Concentración
<b>Cisteína</b>	0.57 mM
<b><math>\beta</math>-mercaptoetanol</b>	50.00 $\mu\text{M}$
<b>Insulina</b>	5.00 mg/l
<b>dbAMPc</b>	1.00 mM
<b>PFF</b>	10% (v/v)
<b>PMSG</b>	10 UI/ml
<b>HCG</b>	10 UI/ml

Medio **TALP**. La solución stock (tabla 4) fue elaborada en el laboratorio con agua ultrapura. A continuación, se esterilizó mediante filtración y se conservó bajo condiciones estériles a 4°C durante un máximo de dos semanas.

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

Componente	Concentración (mM)
<b>NaCl</b>	114.06
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	25.07
<b>KCl</b>	3.20
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O</b>	0.35
<b>MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O</b>	0.50
<b>Lactato Ca•5H<sub>2</sub>O</b>	8.00
<b>Lactato sódico</b>	10.00
<b>Glucosa</b>	5.00
<b>Cafeína</b>	2.00
<b>Sulfato de kanamicina</b>	0.17
<b>Rojo fenol</b>	0.003
<b>PVA</b>	1 mg/ml

Para el cultivo posterior a la ICSI, el medio TALP stock se suplementó con 3 mg/ml de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (BSA-FAF) y 0.12 mg/ml de piruvato sódico, tal y como describen Rath *et al.* (1999). El pH se ajustó hasta 7.4 en un incubador al 5% de CO<sub>2</sub>, 38.5°C y atmósfera saturada de humedad durante 20h antes de su uso.

**Medio NCSU-23.** Siguiendo el protocolo de Peters y Wells (1993), se elaboró 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 BSA-FAF, insulina 0.57mM, β-mercaptoetanol 50μM, 2% (v/v) de BME

(aminoacids solution 50x) y 1% (v/v) de MEM (*non-essential amino acid solution* 100x). Se filtró y se introdujo en el incubador un día antes de su uso.

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

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

Componente	Concentración (mM)
<b>NaCl</b>	108.73
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	25.07
<b>KCl</b>	4.78
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1.19
<b>MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O</b>	1.19
<b>CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O</b>	1.70
<b>Glucosa</b>	5.55
<b>Taurina</b>	7.00
<b>Hipotaurina</b>	5.00
<b>Penicilina G sódica</b>	0.18
<b>Sulfato de estreptomicina</b>	39 UI/ml

Preparación de la **Roscovitina**. A partir de la muestra comercial del R- enantiómero de roscovitina (2-[R]- [1-Etil-2-hidroxietilamino] -6-benzilamino-9-isopropilpurina) se procedió a su dilución en dimetilsulfóxido (DMSO) en concentración stock 10mM. Posteriormente, esta solución se congeló a -20° C hasta su uso.

Preparación del **Inositol 1, 4, 5-trifosfato** (InsP<sub>3</sub>). El InsP<sub>3</sub> se diluyó a una concentración de 0.5µM con una solución buffer (120mM de KCl, 20mM de Hepes, pH 7.4) y se congeló a -20°C hasta su uso (Amano *et al.*, 2003).

### 3.3 MADURACIÓN IN VITRO (MIV) DE OVOCITOS

Los ovocitos fueron obtenidos a partir de ovarios procedentes de hembras prepúberes sacrificadas en matadero. El transporte hacia el laboratorio se realizó en un recipiente isotermo con SS a 38°C en un plazo máximo de 1 hora desde el sacrificio de los animales.

Una vez en el laboratorio, los ovarios se sometieron a dos lavados en Cetab, dos en SS atemperada y se procedió a la obtención de los ovocitos en PBS. Los ovocitos se obtuvieron seccionando con hoja de bisturí los folículos ováricos con un diámetro entre 3-6 mm (figura 4A). El contenido folicular se recogió en tubos estériles y se resuspendió en PBS atemperado dejándolo sedimentar aproximadamente durante 5 minutos. Pasado este tiempo, el sedimento se diluyó con PBS fresco. Bajo el estereomicroscopio (Nikon®) (figura 4B) y a 20 aumentos, se seleccionaron aquellos ovocitos rodeados por varias capas de células del *cumulus oophorus* con un aspecto compacto y con un citoplasma homogéneo y granuloso (figura 4C). 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 (Heraeus®) al 5% de CO<sub>2</sub> y atmósfera saturada de humedad durante al menos tres horas. El cultivo se llevó a cabo en grupos de 45-50 COCs en un volumen de medio de 500µl. Pasadas 20-22 horas de cultivo, los COCs fueron transferidos a medio NCSU-37 libre de PMSG, HCG y dbAMPc donde se lavaron dos veces y se cultivaron durante 20-22 horas (Funahashi y Day, 1993).

Para las experiencias con premaduración en roscovitina, los COCs seleccionados y lavados en los medios de cultivo apropiados se dispusieron en grupos de 45-50 ovocitos en un volumen de 500µl de NCSU-37 libre de PMSG, HCG y dbAMPc en presencia del inhibidor meiótico a 50µM durante un período de 22-28h. Posteriormente estos ovocitos se maduraron siguiendo el protocolo anteriormente citado (Funahashi y Day, 1993).

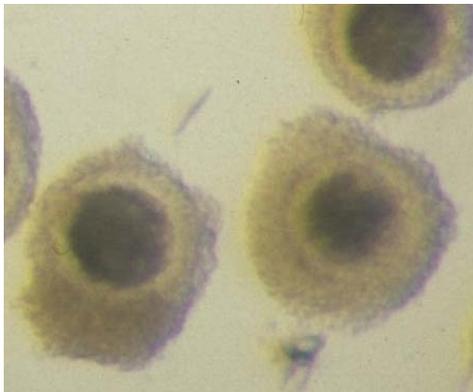
FIGURA 4. A) Sección de folículos ováricos con bisturí. B) Estereomicroscopio Nikon para selección de ovocitos. C) Ovocitos inmaduros con células del *cumulus oophorus* compactas. D) Ovocitos maduros con células del *cumulus oophorus* expandidas



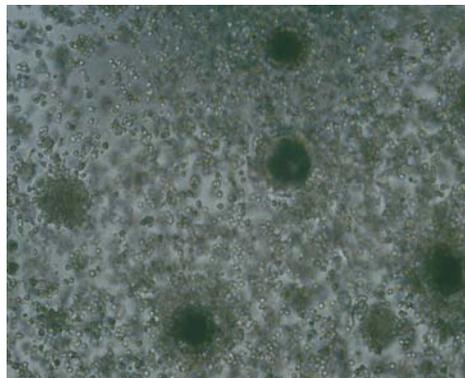
A



B



C

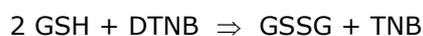


D

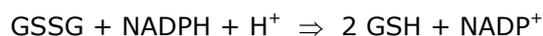
### **3.4 VALORACIÓN DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE GSH**

Para medir la concentración intracelular de glutatión en los ovocitos al final del periodo de MIV se siguió el método descrito por Tietze (1969). Este método está basado en el ensayo cíclico de la enzima 5,5-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico)-glutatión reductasa (DTNB-GSSG) que detecta en los ovocitos tanto el glutatión reducido como el oxidado. Las modificaciones descritas aquí corresponden básicamente a las realizadas por Anderson (1985).

Este ensayo cíclico tiene lugar en dos pasos. En el primero de ellos el glutatión reducido en presencia de DTNB se oxida:



Y en un segundo paso la enzima DTNB-GSSG reductasa cataliza la reacción siguiente:



Siendo:

GSH: forma reducida del glutatión.

GSSG: forma oxidada del glutatión.

DTNB: 5,5-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico).

TNB: 5-thio-2-ácido nitrobenzoico.

NADPH: forma reducida del fosfato del dinucleótido de nicotinamida y de adenina.

NADP<sup>+</sup>: forma oxidada del fosfato del dinucleótido de nicotinamida y de adenina.

El contenido total de glutatión puede estimarse a partir de la producción de TNB que se determina a una absorbancia de 412 nm (UV).

Los **reactivos empleados** fueron los siguientes:

- Ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ).
- Fosfato sódico hidratado ( $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ).
- Fosfato sódico ( $Na_2HPO_4$ ).
- Ácido etilen-diamino-tetracético (EDTA).
- DTNB.
- GSH.
- DTNB-GSSG reductasa.
- NADPH.

Las soluciones necesarias para realizar el ensayo se prepararon con agua purificada a las concentraciones que se indican en la tabla 6.

TABLA 6. Soluciones para el ensayo de glutatión.

Componente	Concentración
$H_3PO_4$	1.25 M
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0.2 M
$Na_2HPO_4$	0.2 M
EDTA	10 mM
DTNB	6 mM
Glutatión reductasa	266 UI/ml

A partir de estas soluciones se prepararon las soluciones tampón stock y de NADPH:

- Solución tampón stock: se preparó una solución 0.2 M de fosfato sódico hidratado y 10 mM de EDTA (solución A). Se preparó otra solución similar pero con fosfato sódico (solución B). Finalmente la solución tampón stock se preparó mezclando las soluciones A y B hasta conseguir un pH final de 7.2.

- Solución de NADPH: consistió en una solución de 0.3 mg de NADPH por ml de solución tampón stock.

Todas las soluciones se prepararon en el día de la realización del ensayo de glutatión, excepto la solución tampón stock y la solución de ácido fosfórico, que se prepararon previamente y se conservaron a temperatura ambiente.

Las muestras se prepararon siguiendo la metodología descrita por Funahashi *et al.* (1994b) y que resumimos a continuación. Las células del *cumulus oophorus* se eliminaron por sucesivos pases de los COCs a través de una pipeta automática (Nichiryo®). A continuación, los ovocitos desnudos se lavaron tres veces en solución tampón stock tomándose finalmente muestras de 30 ovocitos en un volumen de 5µl. Las muestras se depositaron en un tubo Eppendorf al que se le añadieron 5µl de ácido fosfórico 1.25M e inmediatamente fueron almacenadas a -20°C hasta su posterior análisis.

Los patrones se prepararon en el momento de realizar el ensayo a partir de 5 soluciones de GSH a distintas concentraciones conocidas: 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.5mM. Para cada uno de ellos se mezclaron 5µl de la solución de GSH correspondiente y 5µl de ácido fosfórico 1.25M. El patrón "cero" se preparó a partir de 5µl de PBS y 5µl de ácido fosfórico 1.25M.

Las muestras de ovocitos se descongelaron a temperatura ambiente y seguidamente se añadió a cada una de ellas un volumen de 700µl de solución de NADPH, 100µl de solución de DTNB y 190µl de agua purificada. Se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 minutos pasados los cuales se añadieron 10 µl de GSH reductasa para iniciar la reacción. A continuación las muestras se introdujeron en un espectrofotómetro (Beckman DU-40) donde se valoró la formación de TNB a una absorbancia de 412 nm (UV) cada 30 segundos durante dos minutos. Los patrones se trataron bajo las mismas condiciones.

La concentración de GSH en cada una de las muestras se determinó por comparación con la curva estándar preparada con los patrones. La cantidad total de glutatión se dividió por el número de ovocitos en la muestra para obtener el contenido total de GSH por ovocito.

### **3.5 PROCESADO DE LOS ESPERMATOZOIDES**

El semen utilizado procedió de verracos (Landrace x Pietrain) de fertilidad probada pertenecientes al centro de inseminación artificial de la granja Lo Navarro S.A. (Murcia, España).

La recogida de semen se realizó mediante el método manual tomando únicamente la fracción rica del eyaculado. Tras la recogida, se procedió a la preparación de las dosis seminales mediante dilución en BTS a una concentración aproximada de  $3 \times 10^7$  espermatozoides por mililitro, que posteriormente fue transportada al laboratorio. Una alícuota de 10 mililitros de esta dosis se centrifugó a  $1200g$  durante 3 min y el sedimento resultante se diluyó con la solución de PBS suplementado ajustando la concentración a  $5 \times 10^5$  espermatozoides/ml.

### **3.6 INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES**

Tras la maduración de los ovocitos (figura 4D), se procedió a la eliminación de las células del *cumulus* mediante sucesivos pases de los COCs a través de una pipeta automática. A continuación, los ovocitos desnudos se lavaron dos veces en la solución de PBS suplementado y finalmente fueron colocados en las placas de microinyección.

Sobre las placas donde se realizó la microinyección (*Falcon*<sup>®</sup> petri dish 50x9mm) se dispusieron varias gotas centrales de  $4\mu\text{l}$  de la solución de PBS suplementado con  $1\mu\text{l}$  de semen, rodeadas por un número variable de gotas del medio con los ovocitos. Cada gota de  $4\mu\text{l}$  contenía un ovocito. Las microgotas se recubrieron con aceite mineral (*embryo tested*) distribuido por toda la placa de microinyección.

La ICSI se realizó con un microscopio invertido Nikon<sup>®</sup> Diaphot 300 con los correspondientes micromanipuladores *TransferMan*<sup>®</sup> NK (*Eppendorf*) y microinyectores *CellTram Air/CellTram Oil* (*Eppendorf*) (figura 5A y 5B). Una vez preparada la placa se procedió a la microinyección. Mediante una pipeta *Eppendorf*<sup>®</sup> *Custom Tip sterile* (diámetro interno  $8\mu\text{m}$ ) se aspiró un pequeño volumen del medio libre de espermatozoides, y a continuación se dispuso en una gota que contenía espermatozoides donde se seleccionó e inmovilizó al espermatozoide que íbamos a microinyectar, aspirando desde la cola de forma que la cabeza espermática quedaba más cerca de la entrada de la pipeta. Una vez tuvimos al espermatozoide se procedió a la captura del ovocito mediante la pipeta de sujeción (*Eppendorf*<sup>®</sup> *Sterile VacuTips*), colocando el ovocito previamente madurado y desnudo con el corpúsculo polar en posición de

6 ó 12 horarias. A continuación, se presionó con la pipeta de microinyección en la posición de las 3 horarias para atravesar la zona pelúcida y la membrana plasmática (figura 5C). Se aspiró una pequeña cantidad de citoplasma para confirmar que se había atravesado la membrana plasmática del ovocito, y el espermatozoide se inyectó en el interior del citoplasma. Por último, se retiró la pipeta de microinyección y se liberó al ovocito. Tras la microinyección, los ovocitos se lavaron en el medio correspondiente según la experiencia y se dispusieron en el incubador en unas condiciones de 38.5°C, 5% de CO<sub>2</sub> y atmósfera saturada de humedad. La formación pronuclear se valoró sobre las 22 horas después de la microinyección, considerándose como fecundados los ovocitos con dos pronúcleos.

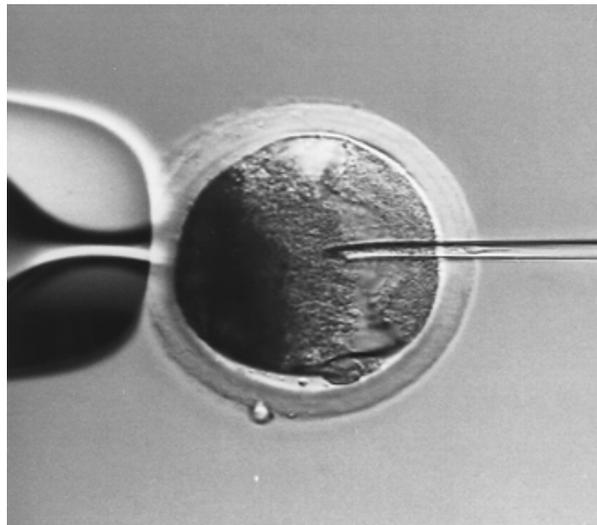
FIGURA 5. A) Microscopio invertido Nikon® Diaphot 300 con los correspondientes micromanipuladores *TransferMan® NK* (Eppendorf) y microinyectores *CellTram Air/CellTram Oil* (Eppendorf). B) Imagen ampliada microinyector y micromanipulador. C) Inyección intracitoplasmática de espermatozoide con pipeta de sujeción y pipeta de inyección, ovocito con CP visible a las 6 horarias.



A



B



C

### **3.7 CULTIVO DE EMBRIONES**

A las 20-24 horas de la fecundación *in vitro*, los presuntos cigotos se trasladaron a medio NCSU-23 previamente equilibrado. En este medio se lavaron 2 veces y se cultivaron durante 24 horas en placas de Petri con un volumen de 0.5 ml de medio. Pasado este tiempo, se seleccionaron bajo el estereomicroscopio únicamente aquellos embriones que se encontraban divididos en estadio de 2-4 células, y se trasladaron a placas de 0.5 ml con medio NCSU-23 fresco. El cultivo de embriones se mantuvo en estas condiciones hasta los 7 días postfecundación a 38.5°C de temperatura y 5% de CO<sub>2</sub> en aire saturado de humedad.

### **3.8 VALORACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS RESULTADOS**

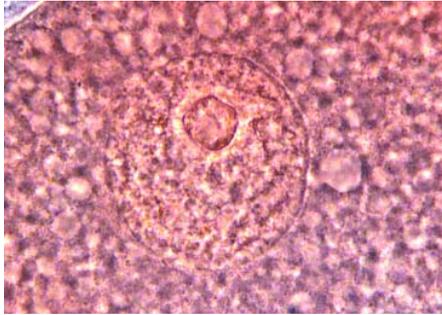
#### **3.8.1 VALORACIÓN DEL ESTADÍO NUCLEAR**

Para valorar el estadio nuclear de los ovocitos cultivados en roscovitina y la progresión meiótica de éstos tras la MIV se fijaron siguiendo la técnica descrita por Chang (1952) con ligeras modificaciones (Coy, 1992). 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%.

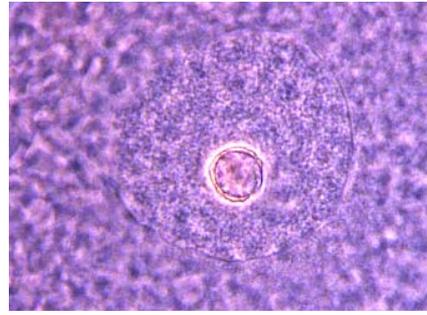
Tras la tinción, las preparaciones se visualizaron a 200-400 aumentos en microscopio de contraste de fases (Nikon®) y se clasificaron como GV-0, GV-I, GV-II, GV-III, GV-IV, Met I, Ana I, Tel I, Met II (figura 6) de acuerdo con los criterios morfológicos de caracterización descritos por Funahashi *et al.* (1997a). GV-0 caracterizado por un nucleolo evidente y cromatina filamentosa localizada en toda el área de la GV; GV-I caracterizado por un nucleolo evidente y cromatina dispuesta en forma de herradura de caballo alrededor del nucleolo; GV-II, caracterizado por un nucleolo evidente con cromatina en forma de herradura de caballo alrededor del nucleolo, pero con algunos agregados de cromatina teñidos localizados principalmente alrededor de la cromatina; GV-III, caracterizado por una red irregular de filamentos bivalentes en el área de la vesícula germinal y sin nucleolo

evidente y GV-IV, caracterizado por la diacinesis de la cromatina. En nuestro estudio, el estadio de GVBD fue incluido dentro de GV-IV.

FIGURA 6. Estadio nuclear de los ovocitos teñidos con lacmoid al 1%, microscopio de contraste de fases, 400X. A) GV0, nucleolo evidente y cromatina filamentosa localizada en toda el área; B) GV-I, nucleolo evidente y cromatina dispuesta en forma de herradura de caballo alrededor del nucleolo; C) GV-II, nucleolo evidente con cromatina en forma de herradura de caballo alrededor, pero con algunos agregados de cromatina teñidos; D) GV-III, caracterizado por una red irregular de filamentos bivalentes en el área de la vesícula germinal y sin nucleolo evidente y E) GV-IV, diacinesis de la cromatina.



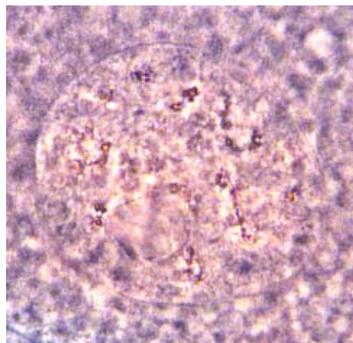
A



B



C

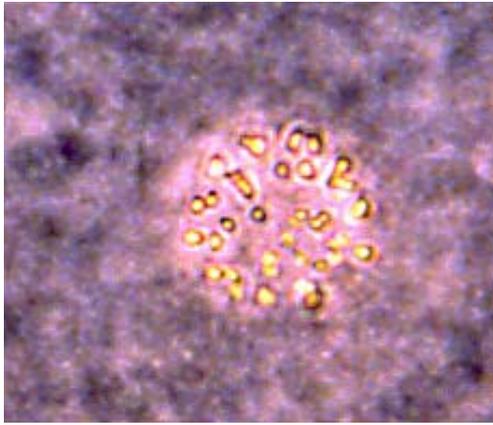


D

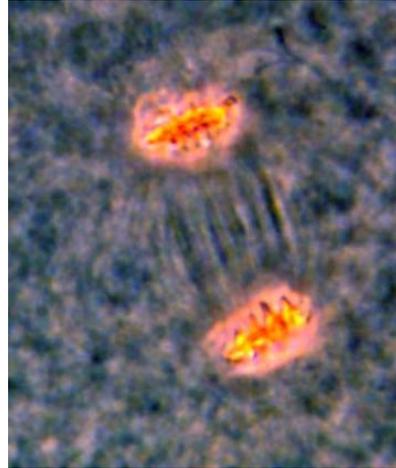


E

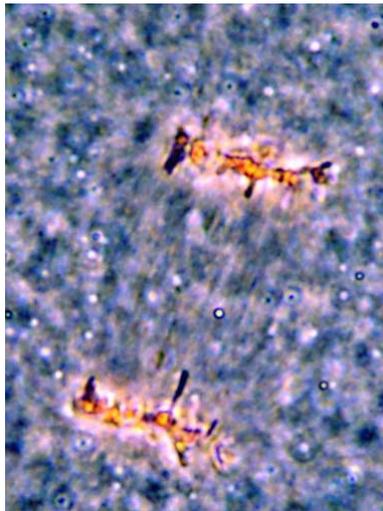
FIGURA 3. Estadio nuclear de los ovocitos teñidos con lacmoid al 1%, microscopio de contraste de fases (1000X). F) Ovocito en Metafase I con los cromosomas dispuestos en el ecuador del huso acromático. G) ovocito en Anafase I con los cromosomas desplazándose hacia los polos del huso. H) ovocito en telofase I con los cromosomas en el polo del huso. I) Ovocito en Metafase II con los cromosomas dispuestos en el ecuador del huso acromático y el primer corpúsculo polar.



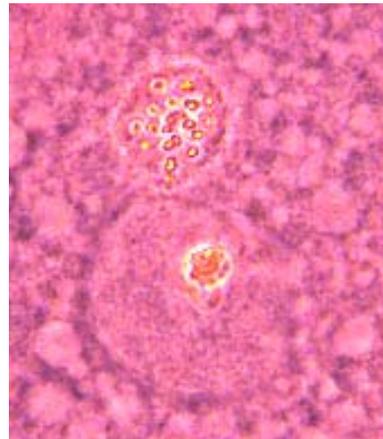
F



G



H



I

### 3.8.2 VALORACIÓN DE LA FORMACIÓN PRONUCLEAR

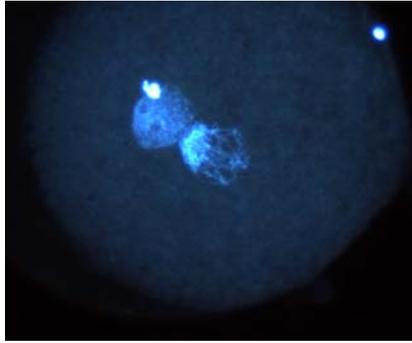
Dependiendo de la experiencia realizada, los ovocitos inyectados se evaluaron siguiendo distintas metodologías. En la experiencia 1 y el primer apartado de ICSI de la experiencia 2, los ovocitos se evaluaron a las 22h tras la ICSI con Iacmoid. El resto de experiencias de ICSI se valoraron mediante la tinción con el fluorocromo Hoechst 33342. Brevemente, los ovocitos se fijaron en glutaraldehído al 0.5% en PBS durante 30 minutos. A continuación los ovocitos fueron lavados de nuevo en PBS y teñidos en la oscuridad con una solución de Hoechst 1mg/ml durante 15 minutos. Por último, a los ovocitos lavados en PBS, se les adicionaron 20  $\mu$ l de una solución de montaje compuesta de Hoechst 1mg/ml, PBS (6.25ml) y glicerol (6.25ml) de la que fueron transferidos en una pipeta Pasteur a un portaobjetos sobre el que se depositó un cubreobjetos que se selló con esmalte.

Tras la tinción, los ovocitos fueron evaluados a 200-400 aumentos con un microscopio Leika® modelo DMLS y filtro de fluorescencia con rango de excitación para luz ultravioleta. Se consideraron ovocitos no activados aquellos que mostraron la placa metafásica, independientemente del estadio del espermatozoide considerándose el resto se como ovocitos activados. Entre estos últimos se encontraban aquellos con presencia de pronúcleo femenino (independientemente del estadio del espermatozoide), estadio de dos células o partenogénicos. Se consideraron ovocitos fecundados aquellos que tuvieran presentes 2 PN, se viera o no el CP en la tinción y aquellos en estadio de dos células (figura 7).

Las variables estudiadas tras la ICSI fueron las siguientes:

- El porcentaje de ovocitos degenerados (**% Degeneración**) con respecto al total de ovocitos inyectados.
- El porcentaje de ovocitos activados (**% Activación**) con respecto a los no degenerados. Dentro de estos ovocitos se encontraban aquellos ovocitos en estadio anterior a 2PN (1PN y una cabeza espermática compacta o descondensada; **% Pre-2PN**), ovocitos en estadio de 2PN (**% 2PN**), estadio de 2 células (**% de embriones**) y ovocitos sin clasificar (**% Otros**).

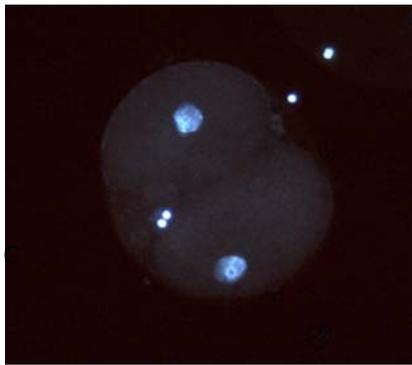
FIGURA 7. Valoración de la fecundación por ICSI mediante la tinción con lacmoid y/o tinción con Hoechst 33342. Microscopio de epifluorescencia. A) Ovocito porcino con dos pronúcleos. Hoechst 33342 (400X). B) Ovocito porcino con dos pronúcleos. Lacmoid (1000X). C) Embrión de 2 células. Hoechst 33342 (200X). D) Embrión de 2 células. Estereomicroscopio (200X). E) Ovocito porcino con tres pronúcleos. Hoechst 33342 (400X). F) Ovocito porcino con un pronúcleo y una cabeza espermática descondensada (1000X). G) Ovocito porcino en metafase II y cabeza espermática compacta (200X).



A



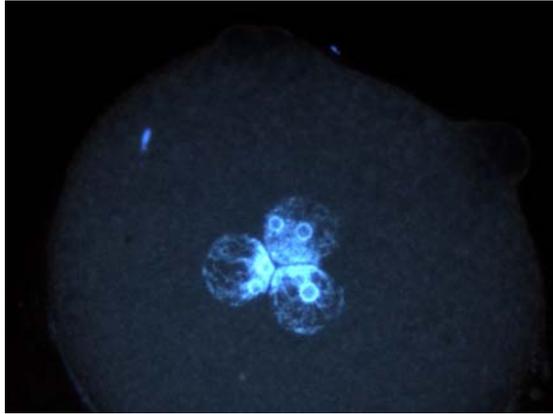
B



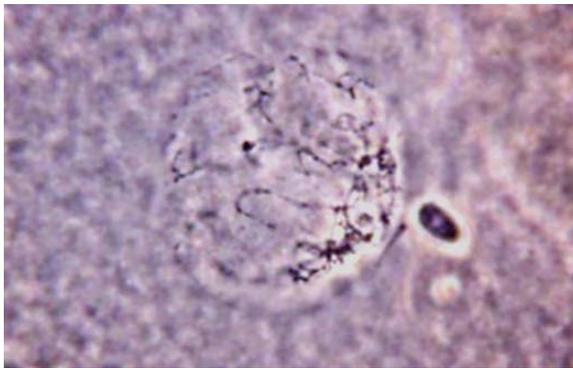
C



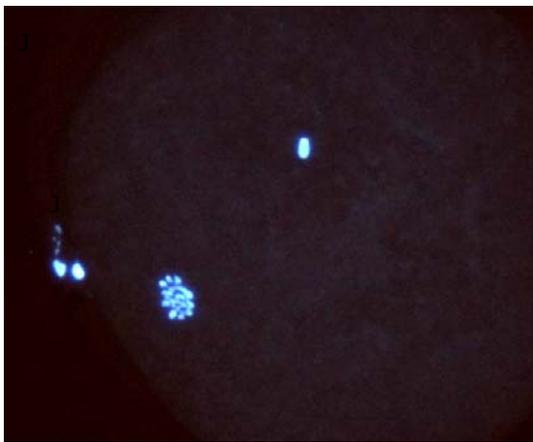
D



E



F



G

### 3.8.3 VALORACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO

Se consideraron embriones divididos aquellos que a las 48 horas postfecundación se encontraban en estadio de 2-4 células con blastómeras homogéneas. Por otra parte, una vez finalizado el período de cultivo de 7 días, se aislaron bajo el estereomicroscopio a 50 aumentos aquellos embriones con aspecto de blastocisto 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 fijaron en alcohol sobre un portaobjetos durante un período de 24h y posteriormente se tiñeron con una solución de Hoescht 33342 al 1% en PBS para teñir los núcleos celulares. Por último, 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 (figura 8).

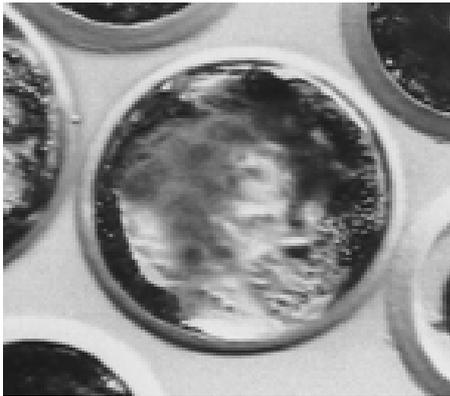
Las variables estudiadas en esta experiencia se detallan a continuación:

- 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.

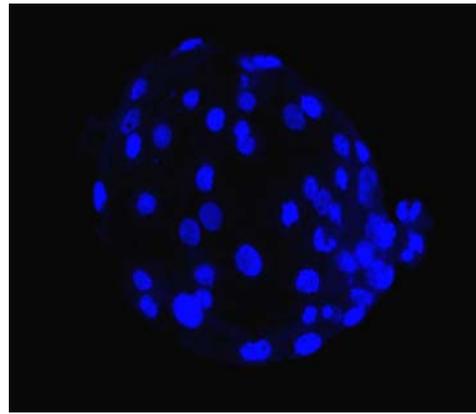
FIGURA 8. A) Embriones porcinos en estadio 2-4 células. Estereomicroscopio (20X). B) Blastocisto cavitado mostrando el blastocele y la masa celular interna. C) Blastocisto teñido con Hoescht 33342 (núcleos de los blastómeros teñidos en azul), epifluorescencia (200X).



A



B



C

### **3.9 TRANSFERENCIAS DE EMBRIONES**

Para la realización de las transferencias se utilizaron 20 hembras cruce de Landrace X Large White múltiparas (2-4 partos) fisiológicamente sincronizadas tras el destete. La detección del celo se realizó mediante verracos recela 2 veces por día. Seguidamente con un ecógrafo modelo Echoscan T-100, se determinó el desarrollo folicular (3-6mm). A las 72h de la ovulación se procedió a realizar las transferencias (figura 9).

#### **3.9.1 TRANSPORTE DE LOS CIGOTOS**

Una vez inyectados los ovocitos se visualizaron bajo un estereomicroscopio para localizarlos. A continuación, se introdujeron mediante aspiración utilizando un auxiliar de pipeteado (Micro-Classic®, Brand) conectado a un catéter *Tom Cat* (Kendall Co., Mansfield, MA, USA) con solución PBS atemperada a 38°C. El transporte se realizó en una estufa portátil a 38°C. La carga del catéter se realizó de la siguiente manera: en primer lugar se dispuso una columna con el medio de cultivo, a continuación se dejó un espacio con aire y luego se cargaron los embriones contenidos en el medio. Posteriormente, se dispuso la segunda columna de aire y la última nuevamente con el medio. La columna con el medio de cultivo (PBS), ubicada en el extremo abierto del catéter, limpia a este en el momento de la descarga. Las presencias de las columnas con aire impiden el desplazamiento de la columna central, que contiene los embriones y la última garantiza la descarga del embrión por efecto de arrastre.

En todos los casos se procuró que el tiempo transcurrido desde la introducción de los cigotos en el catéter hasta la llegada a la granja no fuera superior a 1h.

#### **3.9.2 ANESTESIA**

La anestesia fue realizada con tiopental sódico (Penthotal sódico, Lab Abbott) previa sedación con 120mg de azaperona (*Stressnil*®, Lab Janssen Pharmaceutica) administrados por vía intramuscular. El tiopental fue inyectado en la vena marginal de la oreja a una dilución 1:10 (v/v) para

inducir el estado de anestesia. Posteriormente este estado se mantuvo con la misma droga administrada a una dilución de 1:20 (v/v).

Los animales anestesiados se dispusieron en decúbito supino y fueron inmovilizados sobre la mesa de operaciones.

### **3.9.3 APERTURA DE LA CAVIDAD ABDOMINAL**

Se procedió a la adecuada antisepsia (*Betadine*<sup>®</sup>, Lab Sarget) de la región abdominal en la zona correspondiente a las dos últimas mamas, y al aislamiento del campo quirúrgico mediante la colocación de un paño estéril. A continuación, se realizó una laparotomía ventral mediante incisión con bisturí y se procedió a la disección roma de la grasa subcutánea, incidiendo sobre la fascia y el músculo recto abdominal hasta la visualización del peritoneo. Este último se abrió mediante un pequeño corte con el extremo de una tijera y a continuación se colocó un separador abdominal. Inmediatamente, se localizó un cuerno uterino y se exteriorizó hasta poder visualizar el oviducto y el ovario.

Posteriormente, se observaron con detenimiento los ovarios contándose el número de cuerpos hemorrágicos para asegurarnos que la cerda había completado el proceso de ovulación. A continuación, se localizó en el interior de la bolsa ovárica la abertura del infundíbulo y rápidamente se introdujo el catéter con los cigotos previamente obtenidos por ICSI. Una vez en el interior de los primeros 4-5cm de la luz del oviducto, el extremo del catéter se sujetó suavemente con los dedos a modo de anillo procurando que la adaptación fuera lo más perfecta posible. Mediante la ayuda de una jeringuilla de 1ml conectada al catéter se impulsó el contenido de éste a través del oviducto. Finalmente, se retiró el catéter y se comprobó con la ayuda de un estereomicroscopio la ausencia de cigotos en el mismo.

El cuerno uterino, junto con el oviducto y ovario manipulados fueron lavados con solución salina fisiológica atemperada y reintroducidos en la cavidad abdominal.

### **3.9.4 CIERRE DE LA CAVIDAD ABDOMINAL**

La cavidad abdominal se cerró en 4 planos. En los tres primeros, correspondientes a la capa muscular, peritoneo, fascia de la muscular y al tejido subcutáneo con la grasa propia, se utilizó catgut crómico del número 3 y se realizó una sutura continua con puntos de refuerzo. En cuanto al plano correspondiente a la piel se suturó mediante puntos simples con seda nº 3 y 4.

Para prevenir posibles infecciones se le administró al animal amoxicilina con efecto retardado (Clamoxyl® L.A.) durante 4-5 días y sobre la herida se extendió una capa de Betadine.

### **3.9.5 DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN**

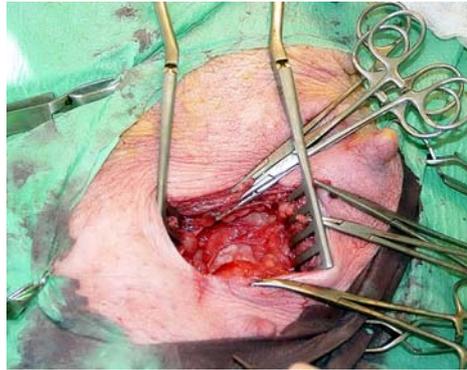
Las hembras intervenidas se mantuvieron bajo las condiciones de granja convencionales y a los 21-25 días de la transferencia embrionaria se llevó a cabo el diagnóstico de gestación mediante técnicas de ultrasonografía (Echoscan T-100).

Se consideró positiva la gestación cuando se visualizaron las vesículas embrionarias de un tamaño de 15 a 20mm de diámetro. Se observaron como áreas bien definidas, regulares y anecoicas.

FIGURA 9. Secuencia de la transferencia de embriones. A) Aislamiento del campo quirúrgico, B) Laparotomía ventral, C y D) Localización del cuerno uterino y exteriorización del oviducto y ovario, E) Localización en la bolsa ovárica de la abertura del infundíbulo e introducción del catéter con los cigotos, F) Reintroducción de cuerno uterino, oviducto y ovario en la cavidad abdominal, G) Cierre de la cavidad abdominal, fascia muscular y peritoneo, H) Cierre de la piel con puntos simples.



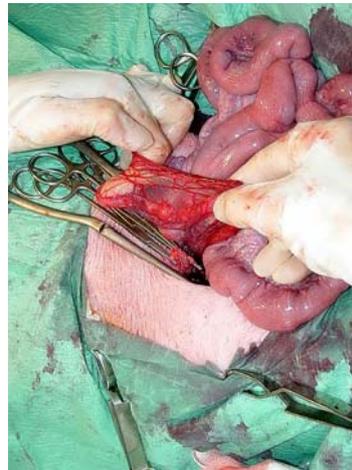
A



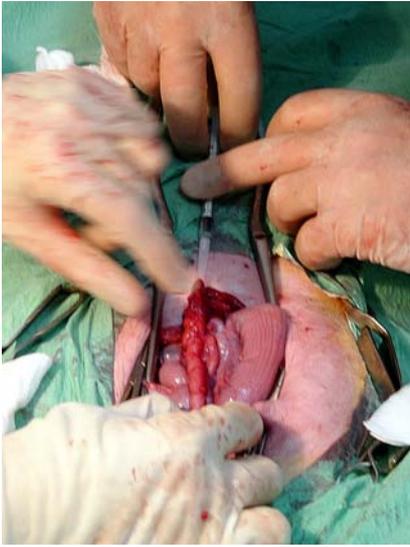
B



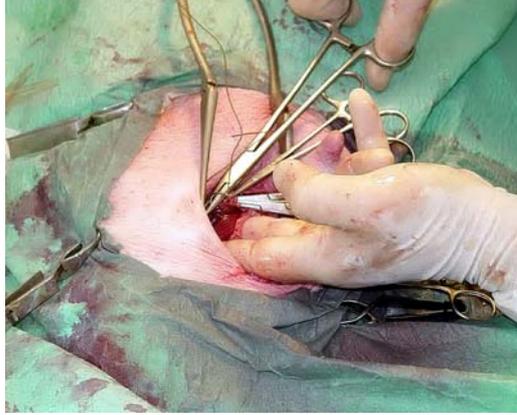
C



D



E



F



G



H

### **3.10 DISEÑO EXPERIMENTAL**

El trabajo se dividió en cuatro experiencias que se detallan a continuación y se reflejan gráficamente en el figura 10.

#### **EXPERIENCIA 1. EFECTO DEL TIEMPO DE CULTIVO EN MEDIO TALP SOBRE LOS PARÁMETROS DE ICSI Y DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO**

Esta experiencia se diseñó para optimizar la secuencia de utilización de los medios de fecundación *in vitro* y de cultivo de embriones (FIV y CE). Este efecto se determinó sobre la fecundación y el desarrollo embrionario.

Los COCs fueron madurados *in vitro* siguiendo el protocolo rutinario de nuestro laboratorio, 44h de MIV en NCSU-37 como se ha explicado anteriormente. Posteriormente, los ovocitos fueron inyectados y cultivados a diferentes tiempos en medio TALP. Los tiempos de cultivo empleados fueron 0h (grupo control), 6h y 20h en medio TALP y posterior cultivo en NCSU-23.

La experiencia quedó subdividida en:

#### **Experiencia 1.1: Efecto del tiempo de cultivo en medio TALP sobre los parámetros de ICSI**

La evaluación de la fecundación se realizó a las 22h de la inyección. Parte de los cigotos fueron fijados y teñidos con lacmoid, y en ellos se valoraron los siguientes parámetros:

- Porcentaje de activación, porcentaje de degeneración, porcentaje pre-2PN, porcentaje de posibles embriones y porcentaje de otros.

Esta experiencia se llevó a cabo en 6 replicados y el total de ovocitos empleado fue de 361.

**Experiencia 1.2: Efecto del tiempo de cultivo en medio TALP sobre el desarrollo embrionario**

La evaluación del desarrollo embrionario se realizó tras el cultivo en NCSU-23 como hemos explicado en el apartado de cultivo embrionario. Valorándose:

- Porcentaje de división, porcentaje de blastocistos y número de células por blastocisto.

Esta experiencia se llevó a cabo en 4 replicados y el total ovocitos empleado fue de 258.

**EXPERIENCIA 2. EFECTO DE DIFERENTES CAMBIOS EN EL SISTEMA DE MADURACIÓN IN VITRO SOBRE LA ICSI Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO IN VIVO****Experiencia 2.1: Estado nuclear de los ovocitos tras 22h de cultivo en roscovitina**

El propósito de esta experiencia fue el de conocer si el cultivo de los ovocitos en medio NCSU-37 sin suplementación hormonal y sin dbAMPc, y con 50 $\mu$ M de roscovitina (ROS) durante las primeras 22 h de maduración mantienen el estadio nuclear al mismo nivel que los ovocitos recién recogidos del ovario. Como grupo control se emplearon los ovocitos recién recolectados. Además, se utilizaron otros dos grupos: los ovocitos cultivados 22h en NCSU-37 con suplementación hormonal y dbAMPc y los ovocitos cultivados durante 22h en el mismo NCSU-37 sin suplementación. De esta manera, podríamos conocer si el efecto inhibitorio de la roscovitina en la progresión nuclear era o no similar al producido por el dbAMPc, que bloquea sólo ovocitos en estadios o anteriores a GV-II, y por otra parte comparar el estadio nuclear de los ovocitos inhibidos por la ROS o por el dbAMPc (grupo ROS y grupo A) y de los ovocitos cultivados en ausencia de inhibidores (grupo B) con el de los ovocitos recién recogidos (control).

Después del cultivo se valoró el estadio nuclear (desde GV-0 hasta MII) en todos los grupos.

Esta experiencia se realizó en 4 replicados con 645 ovocitos.

***Experiencia 2.2: Efecto de la roscovitina sobre la progresión nuclear de los ovocitos***

Esta experiencia fue realizada para valorar la reversibilidad del tratamiento con roscovitina. Para ello los COCs fueron cultivados en dos grupos, el primero, donde el proceso de MIV fue el empleado normalmente en nuestro laboratorio, y un segundo con premaduración de 22h en roscovitina. El estadio nuclear (desde GV-0 a MII) se valoró mediante la tinción con Hoechst 33342.

Esta experiencia se realizó en 3 replicados con 314 ovocitos.

***Experiencia 2.3: Efecto de la roscovitina sobre el contenido en GSH de los ovocitos***

Esta experiencia se realizó para determinar el efecto de la roscovitina sobre el contenido intracelular de GSH. Se emplearon como grupos experimentales ovocitos recién recogidos, ovocitos cultivados durante 22h en presencia o ausencia de roscovitina (50  $\mu$ M), y ovocitos madurados in vitro con o sin un precultivo de 22h en roscovitina (50 $\mu$ M). Se emplearon un total de 960 ovocitos en 7 replicados y el contenido intracelular de GSH se determinó como se describe en la metodología.

***Experiencia 2.4: Efecto de la roscovitina sobre la fecundación por ICSI.***

El objetivo de esta experiencia fue comparar el efecto de la premaduración con ROS y posterior MIV sobre los parámetros de fecundación por ICSI.

Para ello los COCs se recogieron en el mismo día y se maduraron en dos grupos; por un lado, el grupo control, en el que los COCs fueron madurados según el protocolo normal de MIV; por otro, ovocitos premadurados en roscovitina durante un período de 22h y posteriormente MIV, al igual que el grupo anterior. Las inyecciones fueron realizadas en días sucesivos, cumpliéndose el tiempo de MIV de 44h. Los ovocitos recién inyectados se dispusieron en medio TALP. A las 22h tras la ICSI, todos los

cigotos fueron fijados y teñidos con lacmoid valorándose los siguientes parámetros:

- Porcentaje de activación, porcentaje de degeneración, porcentaje pre-2PN, porcentaje de 2PN, porcentaje de embriones y porcentaje de otros.

La experiencia de ICSI se realizó en 7 replicados con 254 ovocitos inyectados.

**Experiencia 2.5: Efecto de la roscovitina sobre el desarrollo embrionario in vivo.**

Esta experiencia fue realizada para valorar *in vivo* la viabilidad de los cigotos premadurados en roscovitina, y evitar las dificultades que presenta el cultivo de embriones *in vitro* en la especie porcina.

Para ello los COCs se recogieron en el mismo día y se maduraron en dos grupos; por un lado, el grupo control, en el que los COCs fueron madurados según el protocolo normal de MIV; por otro, ovocitos premadurados en roscovitina durante un período de 22h y posteriormente MIV, al igual que el grupo anterior. Las inyecciones fueron realizadas en días sucesivos, cumpliéndose el tiempo de MIV de 44h. Posteriormente a la inyección se transfirieron los cigotos a hembras receptoras.

Se realizaron 20 transferencias (10 hembras para el grupo control y 10 para el grupo de roscovitina) con una media de 62 ovocitos transferidos por hembra.

**Experiencia 2.6. Efecto del tiempo de MIV sobre la fecundación por ICSI de ovocitos porcinos premadurados en roscovitina.**

Este estudio se llevó a cabo para evaluar el efecto del tiempo de maduración sobre diferentes parámetros de fecundación mediante ICSI. Para ello los COCs fueron premadurados en roscovitina (50  $\mu$ M), y posteriormente se maduraron según el protocolo normal durante 36h, 40h y 44h. A continuación los cigotos se transfirieron a medio TALP durante un

período de 20-24h y posteriormente se fijaron y tiñeron con Hoechst 33342. Las variables estudiadas fueron las siguientes:

- Porcentaje de activación, porcentaje de degeneración, porcentaje de pre-2PN, porcentaje de 2PN y, porcentaje de otros.

Esta experiencia se realizó en 7 replicados con un total de 456 ovocitos inyectados.

***Experiencia 2.7: Efecto de la premaduración con roscovitina sobre los resultados de ICSI en ovocitos porcinos madurados durante 36h.***

Al observar en el apartado anterior que el grupo de 36h presentaba mayores porcentajes de fecundación, esta experiencia se diseñó para determinar si este efecto venía o no dado por la premaduración en roscovitina. El objetivo de esta experiencia fue comparar el efecto de la premaduración con ROS y posterior MIV de 36h sobre los parámetros de fecundación por ICSI.

Para ello los COCs se recogieron en el mismo día y se maduraron en dos grupos; por un lado, el grupo control, en el que los COCs fueron madurados durante 36h; por otro, ovocitos premadurados en roscovitina durante un período de 22-24h y posteriormente MIV de 36h, al igual que el grupo anterior. Las inyecciones fueron realizadas el mismo día, cumpliéndose el tiempo de MIV de 36h. Los ovocitos recién inyectados se dispusieron en medio TALP. A las 22h tras la ICSI, todos los cigotos fueron fijados y teñidos con Hoechst 33342. Las variables estudiadas fueron las siguientes:

- Porcentaje de activación, porcentaje de degeneración, porcentaje de pre-2PN, porcentaje de 2PN y, porcentaje de otros.

Esta experiencia se realizó en 3 replicados con un total de 192 ovocitos inyectados.

### **EXPERIENCIA 3. EFECTO DEL $InsP_3$ SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO.**

El objetivo de esta experiencia fue el de intentar mejorar la activación ovocitaria, y con ello, el porcentaje final de blastocistos mediante la inyección de  $InsP_3$  junto con el espermatozoide. Para ello, los COCs se maduraron siguiendo el protocolo normal de MIV durante 40h. La microinyección del  $InsP_3$  se realizó siguiendo el mismo protocolo que durante la ICSI. La pipeta de microinyección se llenó de medio con  $InsP_3$  o con la solución del tampón. El llenado de la pipeta de inyección fue de aproximadamente la longitud del espermatozoide. Se realizaron 4 grupos de inyección:

- Grupo **control**: ovocitos inyectados únicamente con espermatozoide en el medio que normalmente utilizamos para la realización de la ICSI.
- Grupo  **$InsP_3$** : ovocitos inyectados con el espermatozoide conjuntamente con el  $InsP_3$ .
- Grupo **sham-tampón**: ovocitos inyectados únicamente con el tampón utilizado para diluir el  $InsP_3$ , de esta manera podríamos valorar si la activación era debida al  $InsP_3$  o al tampón.
- Grupo **sham- $InsP_3$** : ovocitos inyectados con el  $InsP_3$  sin espermatozoide. De esta manera se valora la capacidad del  $InsP_3$  para activar sin presencia del espermatozoide.

La evaluación del desarrollo embrionario se evaluó tras el cultivo en NCSU-23 como hemos explicado en el apartado de cultivo embrionario. Valorándose:

- Porcentaje de división, porcentaje de blastocistos y número de células por blastocisto.

Esta experiencia se realizó en 3 replicados con un total de 215 ovocitos inyectados.

FIGURA 10. Diseño experimental.

NCSU-37<sub>A</sub>: NCSU-37 suplementado con eCG, hCG y dbAMP<sub>C</sub>

NCSU-37<sub>B</sub>: NCSU-37

NCSU-37<sub>ROS</sub>: NCSU-37 suplementado con 50µM roscovitina

MIV: 22 h en NCSU-37<sub>A</sub> seguidas de 22 h en NCSU-37<sub>B</sub>

CE: cultivo embriones

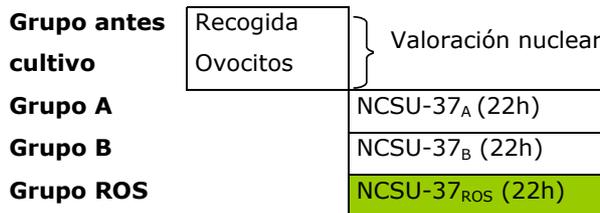
**Experiencia 1. Efecto del tiempo de cultivo en medio TALP sobre los parámetros de fecundación y desarrollo embrionario *in vitro*.**

<b>MIV (44h)</b>	<b>ICSI</b>	Grupo TALP (0h)	NCSU-23	} 22hpi: resultados ICSI CE
		Grupo TALP (6h)	NCSU23	
		Grupo TALP (20h)	NCSU-23	

hpi: horas post-inyección

**Experiencia 2. Efecto de la roscovitina sobre la maduración *in vitro*, fecundación por ICSI y desarrollo embrionario *in vivo*.**

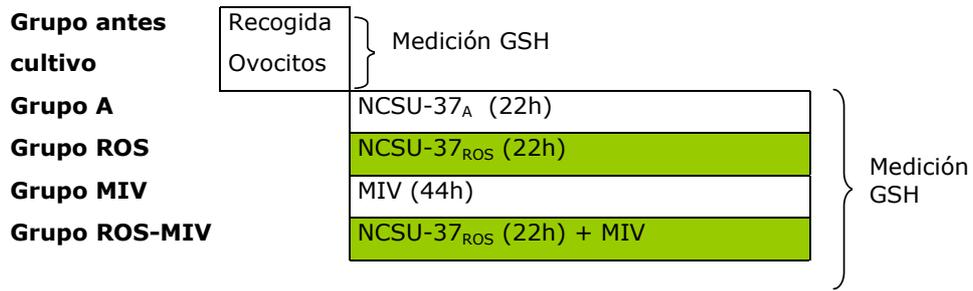
2.1 Estado nuclear de los ovocitos tras 22h de cultivo en roscovitina



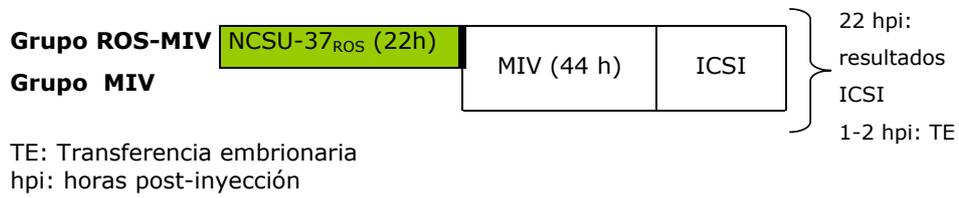
2.2 Progresión nuclear de los ovocitos con premaduración en roscovitina



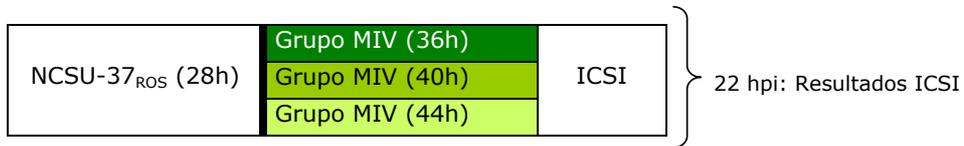
2.3 Contenido intracelular de GSH en ovocitos maduros e inmaduros precultivados con o sin roscovitina



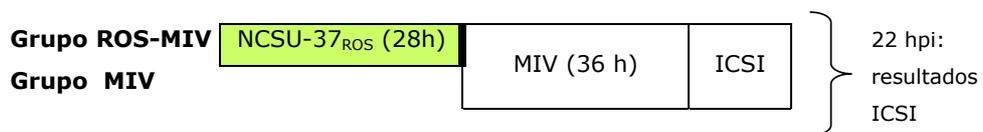
2.4 y 2.5 Efecto de la roscovitina sobre la fecundación por ICSI y desarrollo embrionario *in vivo*

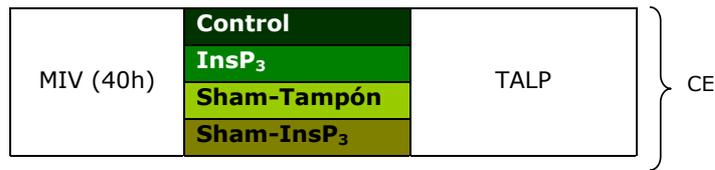


2.6 Efecto del tiempo de MIV sobre la fecundación por ICSI de ovocitos porcinos premadurados en roscovitina



2.7 Efecto de la premaduración con roscovitina en ovocitos madurados durante 36h.



**Experiencia 3. Efecto del  $\text{InsP}_3$  sobre el desarrollo embrionario *in vitro*.****3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados de las variables estudiadas (porcentaje de activación y degeneración ovocitaria, porcentaje de ovocitos en estadio anterior a 2PN; Pre-2PN, porcentaje de ovocitos con 2 pronúcleos y embriones, otros ovocitos, porcentaje de división embrionaria, porcentaje de blastocistos y número medio de células por blastocisto) se expresan como medias  $\pm$  error estándar de la media (SEM).

Para todo el estudio estadístico se utilizó el programa SPSS 11.5 para Windows. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), con una transformación previa de los porcentajes según el modelo binomial de parámetros. 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  $p < 0.05$ .

En la primera experiencia se aplicó un ANOVA de una vía donde el efecto fijo fue las horas de cultivo en medio TALP y las variables estudiadas fueron: porcentaje de degeneración, porcentaje de activación, porcentaje pre-2PN, porcentaje de 2PN, porcentaje de embriones y porcentaje de otros. En la segunda experiencia, la variable utilizada fue el estadio nuclear (desde GV-0 a MII) para los dos primeros apartados y el contenido intracelular de GSH para el tercero. En relación a los apartados de ICSI, las variables analizadas fueron el porcentaje de degeneración, porcentaje de activación, porcentaje pre-2PN, porcentaje de 2PN, porcentaje de embriones y porcentaje de otros. Los efectos fijos fueron el precultivo en roscovitina y las horas de MIV. Los datos de las transferencias quirúrgicas no se analizaron, se describieron. En la tercera experiencia el efecto fijo fue la inyección del  $\text{InsP}_3$  y las variables analizadas: porcentaje de división, porcentaje de blastocistos y número de células por blastocisto.