

MANIPULACIÓ *IN VITRO* D'EMBRIONS DE RATOLÍ: CONTROLS BIOLÒGICS

IMMA MOLINA, LLUISA DIÉGUEZ, CARMEN BLANCO, ALBERT ROMEU,
ANDREA EDO, ALICIA PÉREZ

Unitat de reproducció humana. Laboratori de fertilització *in vitro*. Ciutat sanitària de La Fe.
València.

Resum

S'utilitzaren 325 femelles de ratolí híbrides C B-6 F-1. Foren realitzats 45 controls biològics amb embrions de dues cèl·lules i 9 per ovòcits ovàrics. S'obtingué un total de 622 embrions (2 cèl·lules) i 288 ovòcits ovàrics. El rendiment mitjà per als embrions de ratolí de dues cèl·lules que arribaren a l'estadi de blastocist en expansió fou del 58,76%. El 100% dels ovòcits ovàrics perderen la vesícula germinal i el 74,55% expulsaren el primer corpuscle polar. Es comprovà la validesa del control biològic amb embrions de ratolí com un bon predictor de la qualitat dels medis i el material emprats. S'observaren diferències significatives quant el nombre d'embrions recuperats, el nombre de blastocists obtinguts i el rendiment observat cap a l'estudi de blastocist en expansió en funció del lot hCG utilitzat. Es proposà, com a més adequada, la pauta corresponent a 10 u.i. de FSH i 10 u.i. de hCG.

Cal indicar finalment que el control biològic permet analitzar la qualitat dels medis, materials utilitzats i, així mateix, l'error humà associat a la realització de la tècnica.

Introducció

El cultiu *in vitro* d'embrions preimplantatori i ovòcits ovàrics de ratolí constitueixen les dues tècniques més emprades com a base per establir els distints models d'embriogènesi en mamífers (Biggers and Brinster, 1975; Biggers et al., 1962 i 1965; Brinster, 1963). Més recentment, aquestes tècniques han estat utilitzades per controlar la qualitat biològica dels medis i additius utilitzats en programes de fertilització *in vitro* (FIV) (Kirby, 1962; Marston et al., 1964; Mulnard, 1964 i 1965; New, 1966; Daniel, 1971; Freeman, 1975; Ackerman, 1986). Tot això ha permès el desenvolupament de noves tecnologies aplicades a altres models experimentals (Quinn i Wales, 1973; Whittingham, 1977; Thibault et al., 1975; Witkowski, 1981).

En la posada a punt d'un programa de FIV i la transferència d'embrions (ET) es requereix l'elaboració i la utilització de diferents medis de cultiu així com l'ús de materials diversos dels quals es desconeix la possible embriotoxicitat. Els estudis sobre el desenvolupament d'embrions de ratolí *in vitro* permet investigar l'efecte sobre aquests medis de llurs

diferents condicions físico-químiques: osmolaritat i pH (Brinster, 1965a); efecte de la font d'energia (Brinster, 1965b); font de nitrogen (Brinster, 1965c); interacció entre les distintes fonts d'energia i contingut en proteïnes (Brinster, 1965d i 1967).

Aquest treball es planteja com a objectius avaluar el rendiment obtingut en els diferents controls biològics (amb ovòcits i embrions de ratolí preimplantats) en base a: pautes d'estimulació utilitzades per a la inducció de l'ovulació i superovulació; possible embriotoxicitat dels materials emprats; condicions físico-químiques dels medis de recuperació i cultiu; avaluació de la font de proteïnes més adequada en cada cas.

Material i mètode

1. Elecció de la soca més convenient

Daniel el 1971, Freeman el 1975 i Ackerman et al. el 1986 informen sobre una gran uniformitat en la superovulació, tant en el nombre d'ovòcits ovulats com en el moment de l'ovulació, quan s'utilitza la F-1 híbrida derivada de l'encreuament entre BALB/C i una segona soca. Ackerman et al., el 1986, obté un nombre més elevat d'embrions amb ratolins híbrids CB-6F-1 (BALB/C-C57B6/6).

En relació amb la divisió dels embrions, aquesta difereix d'unes soques a les altres, i els híbrids es mostren superiors en les línies pures (Ackerman et al., 1986).

2. Medis de cultiu

Per a la recuperació d'ovòcits i embrions s'utilitzà solució salina fisiològica i DPBS (Dulbelcos Phosphate Buffer) i per al cultiu s'utilitzà Ham F-10 (liofilitzat o elaborat en el nostre centre) suplementat amb diferents tipus i proporcions de sèrums com a fonts de proteïnes (10% BSA, 20% BSA i 15% de sèrum de cordó). Abans de la seva utilització el medi fou ajustat a un pH de 7,3-7,4 i una osmolaritat de 280 mos/l. i esterilitzat per filtració. L'osmolaritat es mantingué sempre constant i les variacions en el pH (6-7,2; 7,3-7,4; 7,5-9) foren considerades variables a estudiar.

3. Superovulació i inducció de l'ovulació

Per incrementar el nombre d'embrions per cada ratolí i reduir així costos i esforços s'administraren gonadotrofines. Aqueixa tècnica fou descrita inicialment per Cowlers i Edwards el 1957. En aquest treball se seguí la tècnica descrita per Ackerman et al. en 1986, segons la qual s'obtenen bons resultats per injecció intraperitoneal de 5 o 10 u.i. de gonadotrofina sèrica equina (PMSG) i 5 o 10 u.i. de gonadotrofina coriònica humana (hCG) 48 hores després. En la nostra experiència s'utilitzà com a hormona d'acció FSH, Pergonal (laboratori Serono) i com a hormona d'acció hCG, hCG Lepori (laboratori Farma Lepori) i Profasi hCG (laboratori Serono). Les femelles foren aparellades en el moment de la injecció de hCG. L'endemà, s'observà la presència de tap vaginal i els embrions de dues cèl·lules foren obtinguts de l'oviducte 24 hores després de l'observació del tap vaginal o 40-44 hores post-hCG.

4. Fertilització *in vivo*. Recuperació d'embrions i ovòcits

- A) Per a la recuperació d'embrions se sacrifiquen les femelles de 40 a 44 hores post-hCG per dislocació cervical. Se n'extreuen les ampul·les i es col·loquen en plaques de Petri amb 2 ml. de medi de recuperació; es dissequen i es recuperen els embrions que, ràpidament, són introduïts en el medi de cultiu. Solament són utilitzats els embrions en estadi de dues cèl·lules. Aquesta tècnica, així com la que correspon a la perfusió d'ampul·les, fou descrita principalment per Lewis et al. el 1975 i per Hammond el 1949, i revisada i modificada per Whitten et al. el 1961, Daniel el 1971, Freeman el 1975 i Ackerman et al. el 1986.
- B) La recuperació d'ovòcits ovàrics es realitzà sense superovulació ni inducció de l'ovulació. Aquests ovòcits es recuperaren directament dels ovaris de les femelles segons la tècnica descrita per Bonahue el 1968a i 1968g; Chang el 1955, Edwards el 1965 i Kennedy el 1969.

5. Monitorització del creixement *in vitro*

La recuperació d'ovòcits i embrions es realitzà amb un microscopi estereoscòpic, no s'utilitzà cambra de flux laminar i el cultiu *in vitro* s'efectuà en incubador a 37°C amb una atmosfera del 5% de CO₂ en aire i humitat del 90%.

Els ovòcits i embrions foren observats després de 72 h. de cultiu, i es valorà el percentatge d'embrions que arribaren a l'estadi de blastocist en expansió o el percentatge d'ovòcits que completaren la primera divisió meiótica per absència de vesícula germinal i/o presència del primer corpuscle polar.

Es realitzaren els següents càlculs en base a analitzar la qualitat dels medis i materials emprats:

Per a embrions fertilitzats *in vivo*:

REN = Rendiment fins l'estadi de blastocist en expansió = n. de mòrules i blastocists / n. d'embrions en cèl·lules per cent.

RENCP = Rendiment fins l'expulsió del primer corpuscle polar = n. d'ovòcits amb corpuscle polar / n. ovòcits totals (amb o sense vesícula germinal) per cent.

Cal indicar que en alguns casos el primer corpuscle polar es veié danyat, ja que presentava fragmentacions i estats degeneratius a causa del temps de cultiu *in vitro*.

Els controls foren considerats positius quan s'obtingué el rendiment superior al 50%

6. Animals utilitzats i condicions ambientals

S'utilitzà un total de 235 femelles de ratolí híbrid de CB-6F-1. D'elles, 190 foren utilitzades per a l'estudi del desenvolupament *in vitro* d'embrions de ratolí i 45 per a l'estudi del desenvolupament *in vitro* d'ovòcits. Tots els animals foren sacrificats als tres mesos d'edat. El règim d'il·luminació fou de 12 hores de llum i 12 hores de fosc.

7. Anàlisis estadístiques

Per a l'anàlisi estadística de les dades foren utilitzats els següents programes: PID (descripció simple de dades); FIV (anàlisi de la varianza i covariança amb mitjanes repetides); PIR (regressió lineal múltiple). Aquests programes estan inclosos en el paquet estadístic BMDP (Dixon et al., 1983) implementat en l'ordinador UNIVAC 5 100 del Centre de Càlcul de la Universitat Politècnica de València.

Resultats i discussió

A la Taula 1 es detallen els valors mitjans, coeficients de variació i rang de variació (per control realitzat) de les variables estudiades per al desenvolupament *in vitro* d'embrions de ratolí.

TAULA 1. Mitjanes (M); coeficient de variació (CV); i rang de variació de les variables corresponents al desenvolupament *in vitro* d'embrions de ratolí (per control realitzat); IO (inducció de l'ovulació); TF (nombre de femelles que van resultar gestants); EMB (nombre d'embrions de 2 cèl·lules recuperats); REN (percentatge d'embrions de ratolí de 2 cèl·lules que van arribar a l'estadi de blastocist en expansió); BLAS (nombre de blastocists en expansió obtinguts).

Variabes	Unitats	M	CV	Valor màxim	Valor mínim
IO	Nº	4.85	0.3272	7	2
TF	Nº	2.40	0.3529	4	1
EMB	Nº	16.37	0.7794	59	4
BLAS	Nº	8.31	1.0917	43	0
REN	%	53.27	0.5083	90	0

El nombre total de controls realitzats fou de 45, i foren detectades 4 contaminacions que representen el 10% del total. Foren emprades 190 femelles, de les quals 100 resultaren gestants, cosa que suposa una acceptació del mascle del 52%. Aquests resultats estan d'acord amb els exposats en altres experiències (Braden, 1954; Whitter 1956) quant a inducció de l'evolució en femelles de ratolí amb il·luminació controlada. S'obtingueren un total de 622 embrions de dues cèl·lules que determinaren 316 blastocists, cosa que representa un rendiment global del 55,2% Cal indicar que el valor mitjà obtingut per a aquest rendiment no reflecteix el valor real, ja que en les quatre contaminacions detectades el rendiment fou zero, cosa que implica una considerable disminució del valor mitjà per a aquesta variable. Quan s'exclouen els quatre casos en què hi hagué contaminació, la mitjana del rendiment real fou del 58,76% Els elevats coeficients de variació obtinguts són deguts a l'escassa uniformitat de les variables estudiades, ja que la recuperació o no d'embrions, el nombre d'embrions obtinguts i el que aquests embrions assoleixin l'estadi de blastocist en expansió i, així, el seu rendiment final, són variables que no es poden predir i que oscil·len entre zero i un valor màxim per a cada una d'elles.

A la Taula 2 es presenten els valors mitjans coeficients de variació i rang de variació, per control realitzat, per a les variables que corresponen al creixement *in vitro* d'ovòcits

TAULA 2. Mitjanes (M); coeficient de variació (CV); i rang de variació de les variables corresponents al desenvolupament *in vitro* d'ovòcits ovàrics de ratolí (per control realitzat); OVT (nombre d'ovòcits totals); OVG (nombre d'ovòcits amb vesícula germinal); RENVG (percentatge d'ovòcits que van perdre la vesícula germinal); RENCP (percentatge d'ovòcits que van expulsar el primer corpuscle polar).

Variables	Unitats	M	CV	Valor màxim	Valor mínim
OVT	Nº	32.44	0.3348	42	9
OVG	Nº	18.22	0.3809	25	4
OVSG	Nº	14.22	0.3019	20	5
RENVG	%	100.00	0.0000	100	100
RENCP	%	74.55	0.1751	90	50

ovarics de ratolí. Es realitzaren nou controls amb un total de 45 femelles, de les quals es recuperaren 288 ovòcits, 162 amb vesícul germinal i 126 sense. Tots els que presentaren vesícula germinal la perderen i 288 mostraren el primer corpuscle polar després de 72 h. d'incubació, cosa que representa un rendiment del 74,55% per a l'expulsió del primer corpuscle polar i del 100% per a la pèrdua de la vesícula germinal.

Els resultats obtinguts són comparables als observats per altres autors (Chang, 1955; Edwards, 1965; Danahue, 1968a,b; Kenndy, 1969), que indiquen que pràcticament tots els ovòcits ovàrics cultivats *in vitro* perden la vesícula germinal, i a més que un nombre elevat d'aquests ovòcits expulsen corpuscle polar després de diferents intervals de cultiu *in vitro*.

No es detectaren contaminacions. Els coeficients de variació observats posen de manifest una més uniformitat per a les variables que corresponen als controls biològics amb ovòcits ovàrics en relació amb les considerades per als controls amb embrions de ratolí.

A la Taula 3 es presenta la matriu de correlacions per a les variables estudiades en cada un del controls biològics amb embrions de ratolí.

S'observa un coeficient de correlació positiu i significatiu entre REN (rendiment fins l'estadi de blastocist en expansió) i BLAS (n. de blastocists obtinguts), així com entre BLAS i EMB (n. d'embrions de dues cèl·lules recuperats) i entre REN i hCG (lot de hCG utilitzat), cosa que posa de manifest que com més gran sigui el nombre d'embrions recuperats serà també més gran el nombre de blastocists obtinguts, i això donarà lloc, consegüentment, a un rendiment més elevat. Així mateix, el coeficient de correlació observat entre REM i hCG indica que el rendiment es veu influït pel lot de hCG utilitzat.

A la Taula 4 es presenten els coeficients de correlació per a les variables considerades en els controls biològics amb ovòcits ovàrics de ratolí.

RENVG (rendiment fins la pèrdua de la vesícula germinal) no està correlacionat amb cap variable, puix que aquest rendiment fou del 100% Quant el RENCP (rendiment fins l'expulsió del corpuscle polar) està correlacionat amb OVT (n. total d'ovòcits) i per OVSG (n. d'ovòcits sense vesícula germinal); això indica que com més ovòcits es recuperen més gran serà RENCP; així mateix, com més gran sigui el nombre d'ovòcits sense vesícula germinal més gran serà també RENCP. Cal indicar finalment que RENCP es veu influït pels medis utilitzats, tant per a la recuperació com per al cultiu d'aquests ovòcits, encara que en les ANOVAS (anàlisis de varianza) realitzades per a aquestes variables les diferències entre grups no fossin significatives (Taula 8).

TAULA 3. Matriu de correlacions per a les variables en els controls biològics amb embrions de ratolí: REN (rendiment fins a l'estadi de blastocist en expansió); hCG (lots de hCG utilitzats); UI (pauta seguida per l'ovulació i superovulació); TEST (materials provats); RUT (mitjans de recuperació utilitzats); TF (nombre de femelles que van resultar gestants); EMB (nombre d'embrions de dues cèl·lules recuperats); BLAS (nombre de blastocists obtinguts); IO (inducció de l'ovulació).

	REN	hCH	UI	TEST	RUT	TF	EMB	BLAS	IO
REN	1.4000								
hCG	0.4516*	1.0000							
UI	0.2242	0.8918**	1.0000						
TEST	-0.3057	-0.4624*	-0.4124*	1.0000					
RUT	-0.1381	0.6450**	0.7233**	-0.2983	1.0000				
TF	-0.1094	-0.1232	-0.1786	-0.1117	-0.1029	1.0000			
EMB	-0.0966	0.0031	0.1457	0.2191	0.0289	0.1925	1.0000		
BLAS	0.4673*	0.2790	0.1733	0.0588	-0.0727	0.1400	0.7653**	1.0000	
IO	-0.1600	-0.2212	-0.3387	-0.0300	-0.1224	0.7312**	-0.1415	-0.1196	1.0000

* Valors significatius al 5%

** Valors significatius a l'1%

TAULA 4. Matriu de correlació per a les variables utilitzades en els control biològics amb ovòcits ovàrics de ratolí: RENVG (rendiment fins a l'expulsió del primer corpuscle polar); RUT (mitjans de recuperació utilitzats); OVT (nombre total d'ovòcits); OVG (nombre d'ovòcits amb vesícula germinal); OVSG (nombre d'ovòcits sense vesícula germinal).

RENVG	RENC	RUT	OVT	OVG	OVSG
RENVG	1.0000				
RENC	0.0000	1.0000			
RUT	0.0000	0.6068*	1.0000		
OVT	0.0000	0.6386*	0.4187	1.0000	
OVG	0.0000	0.4935	0.3276	0.9797**	1.0000
OVSG	0.0000	0.8177**	0.5295	0.9460**	0.8618**

* Valors significatius al 5%

** Valors significatius a l'1%

A la Taula 5 es representen les ANOVAS (anàlisis de la variança) per a les variables que es poden veure influïdes per les distintes pautes hormonals utilitzades per a la superovulació i inducció de l'ovulació.

No s'observen diferències significatives per a les variables TF (n. de femelles que resultaren gestants), EMB (n. d'embrions de dues cèl·lules recuperades), REN (rendiment fins l'estadi de blastocist en expansió) en funció de la pauta d'estimulació utilitzada (5-10 u.i. tant de FSH com de hCG). Indiquen, tanmateix, que la pauta més apropiada per a la superovulació i inducció de l'ovulació seria la corresponent a 10 u.i. de FSH i 10 u.i. de hCG. No s'observen diferències significatives per a les variables TF i EMB en funció del lot de hCG; això no obstant, les diferències foren significatives a l'1% per a REN en funció del lot de hCG utilitzat.

TAULA 5. ANOVA (anàlisi de la variança) per a les variables TF (nombre de femelles que van resultar gestants); EMB (nombre d'embrions de dues cèl·lules recuperats); REN (rendiment fins l'estadi de blastocist en expansió); amb factors de classificació; hCG (lots de hCG utilitzats) i UI (pauta seguida per a l'ovulació i sense covariables.

Variables	Lot de hCG					Unitats				
	1	2	TOTAL	P.COLA	SLG	5ui	10ui	TOTAL	P.COLA	SIG
TF	2.5	2.29	2.4	0.4806	NS	2.56	2.26	2.4	0.3047	NS
EMB	16.33	16.41	16.37	0.8658	NS	14.37	18.05	16.37	0.4037	NS
REN	41.55	65.67	53.27	0.0065	**	46.75	58.76	53.27	0.1954	NS

SIG (nivell de significació)
 NS (no significatiu)
 ** Valors significatius a l'1%

A la Taula 6 es presenten les ANOVAS per a les variables BAS i REN en funció dels medis utilitzats per a la recuperació dels embrions així com per al material testat.

TAULA 6. ANOVAS per a les variables: BLAS (nombre de blastocists obtinguts); REN (rendiment fins a l'estadi de blastocist en expansió). Factors de classificació: TEST (material testat en 6 nivells); i RUT (medis de cultiu emprats per a la recuperació i cultiu). Sense covariables.

Variables	1	2	3	4	5	6	TOTAL	P.COLA	SIG
REN	70.00	72.00	50.01	66.50	50.00	53.00	58.76	0.4179	NS
			RUT						
	1	2	3	TOTAL	P.COLA	SIG			
REN	60.40	56.57	50.71	53.27	0.6326	NS			
BLAS	11.20	6.75	8.23	8.31	0.6145	NS			

TEST: 1) Tubs de cultiu d'embrions. 2) Tubs d'emmagatzematge de sèrum de cordó. 3) Puntes micropipetes. 4) Sistema de filtració. 5) Cànules de transferència. 6) Material fungible: pipetes, càpsules de Petri, xeringues. RUT: 1) Solució salina fisiològica, Ham's F10 liofilitzat + 10% BSA. 2) Solució salina fisiològica, Ham's F10 liofilitzat + 20% BSA. 3) DPBS, Ham's F10, elaborat en el Centre + 5% sèrum de cordó. SIG = nivell de significació. NS = no significatiu.

No s'observen diferències significatives en relació amb els medis utilitzats per a la recuperació, ni tampoc amb el material testat. Podem suggerir que els materials més desfavorables per la seva possible embriotoxicitat serien les puntes de les micropipetes i la cànula de transferència, pel seu baix rendiment en relació amb el seu valor mitjà. La causa estaria possiblement en el fet que ambdós materials foren esterilitzats amb òxid d'etilè, que pot ser tòxic per als embrions tant humans com de ratolí, tot i que es podria fer una comparació entre material esterilitzat per autoclau i material esterilitzat amb òxid d'etilé.

A la Taula 7 es presenten les ANOVAS per a REN en funció del pH dels diferents lots de medi utilitzats per al cultiu *in vitro* d'embrions. L'osmolaritat romangué sempre constant a 280 Mosm/l.

TAULA 7. ANOVAS per a les variables REN (rendiment fins a l'estadi de blástocist en expansió). Factors de classificació: pH dels mitjans utilitzats). Sense covariables.

	7-8	7	8	TOTAL	P.COLA	SIG
REN	56.67	13.33	67.50	53.27	0.0210	*

SIG (nivell de significació)

* (significatiu al 5%)

Quant al pH dels medis de cultiu, hi ha diferències significatives al 5% per a la variable REN, i es mostren més favorables els pH fisiològics i fins els lleugerament bàsics i clarament desfavorables els pHs àcids. Això indicaria que un pH àcid, dins el rang estudiat, aniria en detriment del creixement *in vitro* dels embrions de ratolí.

A la Taula 8 es presenten les ANOVAS per a la variable REN en funció de cada un dels lots de DPBS, sèrum de cordó i Ham F 10 elaborats en el nostre centre i utilitzats per als controls biològics de qualitat.

Quant als lots de DPBS, les diferències foren significatives a l'1%, i es mostraren més favorables els lots 5 i 3 enfront dels 4 i 2. El lot 1 estava associat a un cas de contaminació.

En relació amb els lots de sèrum de cordó les diferències foren també significatives a l'1%; com a lots favorables 3, 6 i 9 enfront al 8. Els lots 1 i 2, associats a contaminacions.

Finalment, en relació amb els lots de Ham F 10 les diferències també foren significatives a l'1%. Com a lots més favorables 6,14 i 16 enfront d'11 i 13. Lots 2, 3, 4 i 5 associats a les quatre contaminacions que hem esmentat abans. En resum, indicar que els darrers lots tant de medis de recuperació com de cultiu es mostraren més favorables de cara a obtenir un rendiment més elevat, i posaren de manifest una major qualitat biològica d'aquests lots.

A la taula 9 es presenten les ANOVAS per a les variables corresponents als controls biològics amb ovòcits per ratolí.

El RNVG fou del 100% i, per tant, no es veié efectat per cap variable. En relació amb el REMCP no s'observaren diferències significatives en relació amb els medis utilitzats per a la recuperació i el cultiu d'ovòcits ovàrics de ratolí, tot i que el lot més adequat correspon a DPBS, Ham F 10 + 15% sèrum de cordó.

Conclusions

1. Es comprova la validesa del control biològic amb embrions de ratolí com un bon predictor de la qualitat dels medis i el material analitzat.
2. La consecució de la maduració meiòtica *in vitro* dels ovòcits de ratolí és menys influenciable pels medis de recuperació i cultiu utilitzats que el creixement *in vitro* dels embrions de ratolí de dues cèl·lules fins l'estadi de blastocist en expansió. Per tant, es proposa el control biològic amb embrions de ratolí com el més adequat, ja que és el més capaç de detectar les possibles variacions físico-químiques entre els distints medis i materials testats.

TAULA 8. ANOVAS (anàlisis de variances). Per a la variable REN (rendiment fins a l'estadi de blasatocist en expansió). Factors de classificació: LOPBS (lot de DPBS amb 5 nivells); LSC (lot de sèrum de cordó amb 9 nivells), BHAM (lot de HAM's F-10 amb 16 nivells). Sense covariables.

	1	2	3	4	5	TOTAL	P.COLA	SIG											
REN	00.00	64.71	73.00	63.00	68.75	58.76	0.0002	**											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TOTAL	P.COLA	SIG							
REN	0	0	81.83	63.20	65.33	68.75	63.00	50.00	68.75	57.95	0.0001	**							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	TOTAL	P.COLA	SIG
REN	66.66	00.00	00.00	00.00	00.00	81.33	63.00	63.20	63.20	65.33	63.10	50.00	40.00	73.00	67.50	70.00	50.51	0.0001	**

SIG (S) = Nivell de significació.
 ** Significatiu a l'1 %.
 P.C. = P. Cola.

TAULA 9. ANOVA (anàlisi de variança) per a les variables corresponents als controls biològics amb ovòcits ovàrics de ratolí: RENVG (rendiment fins a la pèrdua de la vesícula germinal); RENCN (rendiment fins a l'expulsió del primer corpuscle polar). Factor de classificació: RUT (medis de recuperació i de cultiu emprats amb tres nivells). Sense covariables.

Variables	RUT					
	1	2	3	TOTAL	P.COLA	SIG
RENVG	100	100	100	100	—	—
RENCN	68.33	71.50	90.00	74.55	0.1555	NS

SIG (nivell de significació).

NS (no significatiu).

3. S'observen diferències significatives quant al nombre d'embrions recuperats, nombre de blastocists obtinguts i rendiment fins l'estadi de blastocists en expansió segons el lot de hCG utilitzat. Es proposa com a pauta més adequada 10 u.i. de FSH i 10 u.i. de hCG.
4. El pH àcid té un efecte deleteri per al creixement *in vitro* d'embrions de ratolí. El pH bàsic no afecta aquest creixement en els rangs de pH considerats.
5. S'observen uns rendiments més bons amb els darrers lots de medi utilitzats, cosa que reflecteix tant una millora en la qualitat dels medis com en la manipulació dels embrions *in vitro*.

Agraïments

El nostre agraïment a la Càtedra de Fisiogenètica Animal del Departament de Ciència Animal de l'Escola Tècnica Superior d' Enginyers Agrònoms per la seva col·laboració i el seu ajut en l'anàlisi estadística de les dades.

Agraïm també al personal encarregat de l'estabulari del Centre d'Investigació de l'Hospital de «La Fe» la cura dels animals utilitzats al llarg de l'experiència.

Bibliografia

1. ACKERMAN S, SWANSON RI. (1986). In vitro fertilization embryo development in mice. In in vitro fertilization at Norfolk. Ed Jones HW; Seegar G; Hodgen GD; Rosenwaks Z.

2. BRADEN AWH i AUSTIN CR. (1954). The fertile life of mouse and rat eggs. Science 120: 610-11.

3. BIGGERS JD, GWATKIN RBL i BRINSTER RL. (1962). Developement of mouse embryos in organ culture of fallopian tubes on a chemically defined medium. Nature 194: 747-49.

4. BIGGERS JD i BRINSTER RL. (1965). Biometrical problem in the study of early mammalian embryos in vitro. J Exp Zool 158: 39-48.

5. BIGGERS JD, MOORE BD i WHITTINGHAM DG. (1965). Development of mouse embryos in vivo after cultivation from two-cell ova to blastocysts in vitro. Nature 206: 734-35.

6. BIGGERS JD. (1965). Studies on the development of mouse embryos in vitro IV: Interaction of energy sources. J Reprod. Fertil. 10: 227-40.

7. BIGGERS JD. (1965). Studies on the development of mouse embryos in vitro I: The effect of osmolarity and hydrogenion concentration. J Exp Zool. 158: 49-59.

8. BIGGERS JD. (1965). Studies on the development of mouse embryos in vitro III: The effect of fixe nitrogen source. J Exp Zool. 158: 69-77.

9. BIGGERS JD. (1965). Studies on the development of mouse embryos in vitro III: The effect of energy source. *J Exp Zool* 158: 59-68.
10. BIGGERS JD. (1967). Project content of the mouse embryo during the first five days of development. *J Reprod Fertil* 13: 413-20.
11. BRINSTER RL. (1963). A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Exptl Cell Res* 32: 205-08.
12. CHANG MC. (1955). The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in the fallopian tubes. *J Exp Zool* 128: 379-410.
13. DANIEL C. (1971). *Method in Mammalian Embryology*. Ed. Daniel C. Jr. Academic Press.
14. DIXON WJ, BROW MB, ENGELMAN L, FRANE JW, HILL MA, JENNRICH RI, TOPOREK JD. (1983). *Statistical software*. University of California Press.
15. DONAHUE RP (1968). Maturation of the mouse egg in vitro. Ph D Thesis, the Johns Hopkins University School of Medicine.
16. DONAHUE RP i STERN S. (1968). Follicular cell support of oocyte maturation: Production of pyruvate in vitro. *J Reprod Fertil* 17: 395-398.
17. EDWARDS RG (1965). Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, Rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 208: 349-351.
18. FOWLER RE i EDWARDS RG (1957). Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins. *J Endocrinol* 15: 374-84.
19. FREEMAN HW. (1975). In the early development of mammals. Ed Balls M, Wild AE. Cambridge University Press.
20. HAMMOND J, Jr. (1949). Recovery and culture of tubal mouse ova. *Nature* 163: 28-29.
21. KENNDY JF i DONAHUE RP. (1969). Human oocytes: Maturation in chemically defined medium. *Science* 164: 1292-1293.
22. KIREY BRS. (1962). The influence of the uterine environment on the development of mouse eggs. *J. Embryol Exp Morph* 10: 465-506.
23. LEWIS WH i WRIGHT ES. (1935). In the early development of the mouse egg. *Carnegie Contribution to Embryology* 25: 115-144.
24. MARSTON JH i CHANG MC. (1964). The fertilizable life of ova and their morphology following delayed insemination nature and immature mice. *J Exp Zool* 155: 237-52.
25. MULNARD JG (1964). Obtention in vitro du développement continu de l'oeuf de souris du stade II au stade du blastocyste. *CR Acad Sci (Paris)* 258: 6228-29.
26. MULNARD JG. (1965). Studies of regulation of mouse ova in vitro. In *Preimplantation Stages of pregnancy*, CIBA Foundation Symposium, eds. GEW. Wolstenhome and M O'Connor. Boston: Little, Brown and Co. pp 123-138.
27. NEW CAT i STEIN KF. (1963). Cultivation of mouse embryos in vitro. *Nature* 199: 297-99.
28. QUINN R, WALES RG. (1973). Growth and metabolism of preimplantation mouse embryos cultured in phosphate-buffered medium. *J Reprod Fertil* 35: 289-300.
29. THIBAUT C, GERARD M, MENEZO Y. (1975). Preovulatory and ovulatory mechanisms in oocyte maturation. *J Reprod Fertil* 45: 605-10.
30. WHITTEN WK i DAGG CP. (1961). Influence of spermatozoa on the cleavage rate. *Fertil Steril* 20: 453-55.
31. WHITTEN WK. (1956). Culture of tubal mouse ova. *Nature* 177: 96.
32. WHITTEN WK (1966). Pheromones and mammalian reproduction. *Adv Reprod Physiol* 1: 155-78.
33. WHITTINGHAM DG. (1977). Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at 196°C. *J Reprod Fertil* 49: 89.
34. WITKOWSK A. (1931). Pronuclear development and the first cleavage division in polyspermic mouse eggs. *J Reprod Fertil* 62: 493-98.