

TRABAJOS ORIGINALES

EVALUACIÓN DE OVOCITOS DE VACA PARA MADURACIÓN EN CULTIVO

De los Reyes, M* .,
Aguayo, J.P*.,
del Campo, H.* *
y Barros, C.* **

COW OOCYTES EVALUATION FOR CULTURE MATURATION

SUMMARY

Morphological characteristics previously determined in a non-invasive qualification pattern, were used to estimate the in vitro maturation of bovine oocytes. Follicles of 2 - 6 mm were aspirated from ovaries obtained from a slaughterhouse. By using of a stereoscopic microscope, oocytes were classified into 6 categories based on the appearance of their cytoplasm and presence or absence of oocyte layers: 1 oocytes with a homogeneous granulate cytoplasm and totally surrounded by cumulus cells; 2 oocytes with a homogeneous granulate cytoplasm and partially surrounded by cumulus cells; 3 oocytes with a homogeneous granulate cytoplasm and no cumulus cells; 4 oocytes with polarized cytoplasm and totally surrounded by cumulus cells; 5 oocytes with polarized cytoplasm and partially surrounded by cumulus cells; 6 oocytes with polarized cytoplasm and no cumulus cells. Oocytes in each category were separately incubated in cultured medium TCM -199 for 24 hours at 39°C in air with 5% CO₂ and 98% humidity. Maturation was evaluated with a phase contrast microscope determining nuclear maturation stages: germinal vesicle; germinal vesicle breakdown; formation of metaphase I and II plates and oocyte degeneration. A total of 1206 in vitro cultured oocytes were studied. Oocytes categories 1 and 2 had the higher in vitro maturation rates, 75.3% and 68.6% respectively (p<0.05). The categories 4 and 5 obtained in vitro maturation rates of 55.5% and 47.2% respectively. The lowest in vitro maturation rates were observed in categories 3 and 6 with 34.9% and 30.9% respectively (p<0.05). Cell viability evaluated with FDA was 80.7% before culturing and 77.2% after culturing. It is concluded that oocyte selection before culture, using non-invasive techniques, may produce an increase in the in vitro maturation rates. An homogeneously granulate ooplasm and the presence of cumulus cells around the oocyte were the characteristics which had more influence on the oocyte maturation.

Palabras claves: ovocitos, maduración *in vitro*

Key words: oocytes, *in vitro* maturation

* Unidad de Reproducción,
Facultad de Ciencias Veterinaria y Pecuarias,
Universidad de Chile.

** Instituto de Reproducción,
Universidad Austral de Chile

*** Laboratorio de Embriología,
Facultad de Ciencias Biológicas,
Pontificia Universidad Católica de Chile,

Financiado por proyecto FONDECYT 1971234

INTRODUCCIÓN

Los primeros trabajos de fecundación *in vitro* en bovinos utilizaron ovocitos recuperados de hembras superovuladas y espermatozoides capacitados en el útero de conejas (Iritani y Niwa, 1977; Hanada y Nagase, 1981). Estudios

posteriores han utilizado ovocitos madurados en condiciones *in vitro*, así como espermatozoides seleccionados y capacitados en medio de cultivo (Greve y col., 1987; Xu y col., 1987; Goto y col., 1988; 1989; Kim y col., 1990; Bavister y col., 1992; Lonergan y col., 1997).

La maduración del ovocito *in vivo* se inicia después de las 20 horas desde el peak preovulatorio de gonadotropina (Hyttel y col., 1997), donde se inician una serie de procesos bioquímicos en el gameto conducentes a cambios morfológicos y funcionales (Downs, 1993). A nivel nuclear, el ovocito reinicia la meiosis detenida en la etapa de dictiateno de la primera profase meiótica, para alcanzar el estado de metafase de la segunda división meiótica, siendo ovulado en este estado, conocido como metafase II (Wassarman, 1994). La maduración *in vitro* implica por tanto, no sólo el reinicio de la meiosis, sino además que el ovocito adquiera competencia para ser fecundado y competencia de desarrollo. Sin embargo, la tasa de desarrollo *in vitro* de ovocitos madurados y fecundados *in vitro* ha sido baja en comparación a los madurados *in vivo* (Greve y col., 1987; Thibault y col., 1987; Hawk y col., 1992; Brackett y Zuelke, 1993; Im y Park, 1995). Esta baja tasa de éxito se debe en parte, a que las características y condiciones apropiadas que conducen al desarrollo *in vitro*, no son aún bien conocidas.

Una fuente importante de ovocitos la constituyen ovarios obtenidos de vacas de matadero, los cuales proporcionan una abundante cantidad de ovocitos, pudiendo ser madurados y fecundados *in vitro*. Existe, sin embargo, una gran variación en la apariencia de estos ovocitos bovinos inmaduros (Leifried y First, 1979; Hyttel y col., 1986; de Loos y col., 1989; Madison y col., 1992; Hazeleger y col., 1995). La adecuada selección de los ovocitos para ser madurados en el laboratorio es crucial para el éxito de la fecundación y el desarrollo embrionario subsecuente. Las características morfológicas del ovocito a madurar son importantes (Leifried y col. (1986), ya que de ello dependerá, que pueda reiniciar la meiosis (Moor, 1990; Wassarman, 1994), así como la maduración citoplasmática (Barros, 1987); Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue

establecer un patrón de clasificación no invasivo (mediante microscopía de luz) de ovocitos de bovino, estableciendo categorías que permitan identificar mejor a aquellos gametos que se vayan a utilizar y puedan tener mejores probabilidades de manipulación y maduración en cultivo, logrando optimizar de esa forma, los protocolos para la fecundación *in vitro* en esta especie.

MATERIAL Y METODOS

Obtención y preparación de las muestras

Se trabajó con 1206 ovocitos provenientes de ovarios de hembras bovinas en diferentes estados fisiológicos sacrificadas en mataderos locales. Los ovarios se transportaron en una solución salina de NaCl (0,9%) a temperatura ambiente suplementada con antibióticos (100 mg/ml de estreptomina y 100 U.I/ml o 60 mg/ml de penicilina sódica) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) (De los Reyes, 1992).

Se utilizaron ovocitos obtenidos de los folículos antrales de 2 - 6 mm de diámetro según las técnicas descritas por De los Reyes y col. (1996), los cuales se lavaron a través de pipeteo suave 3 - 4 veces en medio TCM 199 (Gibco, Grand Island NY # 380-2340) suplementado con de 10% de suero fetal bovino inactivado (Gibco).

Clasificación de los ovocitos

Antes de iniciar el cultivo para inducir la maduración, los ovocitos obtenidos se clasificaron en un microscopio estereoscópico, en seis categorías según sus características citoplasmáticas y de cubiertas ovocitarias (células del cúmulo) (Cuadro 1) (Leibfried y First, 1979; de Loos y col., 1989).

Control de la Viabilidad

Después de la clasificación de los ovocitos, se hicieron controles de viabilidad a un 10% de la población de huevos, mediante el fluorocromo diacetato de fluoresceína (FDA), según la técnica descrita por Barros y col. (1982). En breve, consistió en la preparación de una solución de FDA, diluída 1:1000 (10 mg/ml de acetona), donde se colocaron los ovocitos por 5 minutos previo a su observación en el microscopio de epifluorescencia. Sólo se consideraron viables

aquellos ovocitos que presentaron una fluorescencia muy brillante.

Maduración *in vitro* de los ovocitos

Cada categoría ovocitaria se maduró *in vitro* en forma separada, depositando aproximadamente 10 ovocitos en gotas de 50 µl de medio de cultivo cubiertas con aceite mineral estéril (Squibb®) dentro de cápsulas Falcon # 3001. El medio de cultivo utilizado fue el TCM 199 (Gibco®) (Sirard y col., 1988; Lim y col., 1992), suplementado al momento de usarlo con 10% de suero fetal bovino (Gibco®), 0,2 mM de piruvato de sodio (Sigma®), 5 mg/ml (0,005 U/ml) de FSH-P (Sigma®) (De los Reyes, 1992) y 1 mg/ml de gentamicina (Sigma®). El medio de maduración se esterilizó por filtración a través de membranas Millipore de 0,22 µm estériles.

La maduración *in vitro* de los ovocitos se hizo a 39°C (Lenz y col., 1983) en una atmósfera de 5% de CO₂ con 98% de humedad, por un período de 24 horas (Lim y col., 1992)

Evaluación de la Maduración

Luego de completar el período de maduración, los ovocitos de cada categoría se lavaron en medio TALP- bicarbonato (Parrish y col., 1988) eliminándose las células del cúmulo mediante agitación por 5 minutos en vortex. Los ovocitos desnudos se montaron en portaobjetos y se fijaron en ácido acético - etanol (1:3) por 24 horas antes de la tinción, la que se hizo con aceto-orceina (1% de orceina y 45% de ácido acético) (Shamsuddin y col., 1993). Los ovocitos se evaluaron en un microscopio de contraste de fase, usando como criterio de maduración, los siguientes estados:

- *Vesícula Germinativa*: ovocito con envoltura nuclear intacta
- *Vesícula Germinativa ausente*: desaparición de la envoltura nuclear
- *Metafase I* : Reinicio de la meiosis, la cromatina presente se encuentra en placa metafásica sin evidencias del primer cuerpo polar en el espacio perivitelino
- *Metafase II* : cromatina en placa metafásica,

presencia del primer corpúsculo polar en el espacio. perivitelino.

- *Degenerado*: ovocito alterado en su desarrollo, con cambios notorios de degeneración: citoplasma vacuolar o fragmentado, cromatina dispersa y aumento marcado del espacio perivitelino.

Análisis de los resultados

Se realizó un total de 10 réplicas experimentales. En cada oportunidad se trabajó con 100 a 150 ovocitos. Se hicieron análisis de varianza utilizando la prueba de Student-Newman-Keuls (SNK) para determinar diferencias estadísticas entre las distintas categorías (Sokal y Rohlf, 1981).

RESULTADOS

Un total de 1206 ovocitos de hembras bovinas se maduraron *in vitro* por 24 horas en medio TCM 199 suplementado. Los ovocitos se clasificaron en distintas categorías (Cuadro 1; Figura 1); los porcentajes de maduración obtenidos en las seis diferentes categorías se presentan en la Cuadro 2.

La categoría de los ovocitos que mantenían las células del cúmulo (1, 2 y 3) mostraron, a la observación por lupa estereoscópica, expansión (mucificación) de éstas luego de la maduración *in vitro* por 24 horas (Figura 2a). La maduración completa de los ovocitos se evidenció en aquellos huevos que habían reiniciado la meiosis, quedando sus cromosomas en la segunda placa metafásica, con eliminación del primer corpúsculo polar (Figura 2b).

De la población de ovocitos estudiados (1206), los correspondientes a la categoría 1 (287), es decir a aquellos con citoplasma homogéneo y totalmente cubierto por una masa compacta de células del cúmulo oosfero, 75,3% llegaron al estado de metafase II, valor significativamente diferente ($p < 0,05$) a las otras cinco categorías de ovocitos (Figura 3)

Las categorías 3 y 6, que correspondieron a los ovocitos con citoplasma homogéneo o polarizado respectivamente, pero desprovistos

**CUADRO
Nº 1**

**CLASIFICACIÓN DE OVOCITOS DE BOVINO
PARA LA MADURACIÓN IN VITRO.
BOVINE OOCYTES CLASSIFIED INTO SIX CATEGORIES
FOR IN VITRO MATURATION**

CATEGORIAS	1	2	3	4	5	6
NUCLEO						
Vesícula Germinativa	+	+	+	+	+	+
CITOPLASMA						
Homogéneo	+	+	+	-	-	-
Polarizado	-	-	-	+	+	+
CELULAS DEL CUMULO						
Totalmente cubierto	+	-	-	+	-	-
Parcialmente cubierto	-	+	-	-	+	-
Denudado	-	-	+	-	-	+
+ = presente - = ausente						

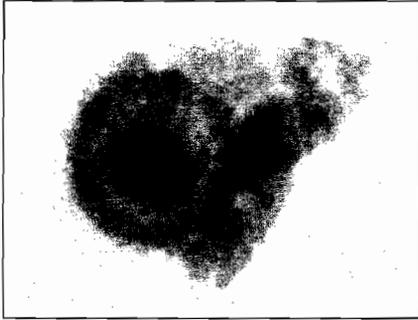
**CUADRO
Nº 2**

**ESTADOS DE MADURACIÓN DE OVOCITOS DE BOVINO,
CULTIVADOS IN VITRO POR 24 HORAS
MEIOTIC MATURATION OF BOVINE OOCYTES
THROUGH 24 HOURS IN CULTURED**

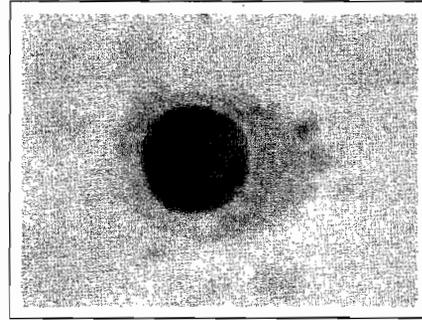
Categoría	Ovocitos	V. G	V. G. A	M I	MII	Deg.
ovocitos	Nº / %	Nº / %	Nº / %	Nº / %	Nº / %	Nº / %
1	287/24	14 / 4,9 ^a	2 / 0,7 ^a	45 / 15,7 ^a	216 / 75,3 ^a	10 / 3,5 ^a
2	231/19	14 / 5,6 ^a	9 / 3,8 ^{ab}	50 / 20,9 ^{bc}	154 / 64,4 ^b	13 / 5,4 ^c
3	123/11	15 / 12,2 ^a	13 / 10,6 ^c	31 / 25,2 ^c	43 / 34,9 ^c	21 / 17,1 ^{bd}
4	238/20	20 / 8,4 ^a	16 / 6,7 ^{bc}	47 / 19,7 ^{ab}	132 / 55,5 ^d	22 / 9,2 ^c
5	214/18	24 / 11,2 ^a	15 / 7,0 ^{abc}	45 / 21,0 ^{bc}	101 / 47,2 ^e	30 / 14,0 ^d
6	113/ 9	13 / 16,5 ^a	12 / 10,6 ^c	27 / 23,9 ^{bc}	35 / 31,0 ^c	25 / 22,1 ^e
Total	1206	100/8,3	67/5,5	418/34,6	681/56,4	121/10

* Letras distintas implican diferencias significativas $p < 0,05$

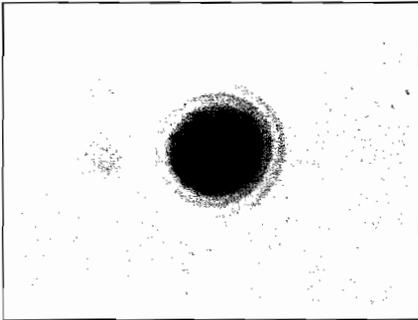
Categoría 1



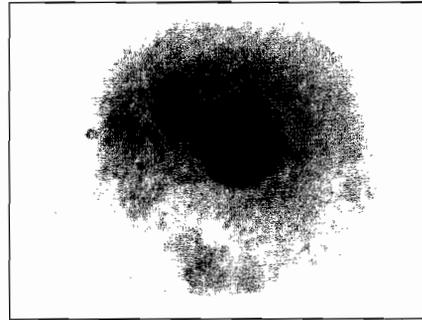
Categoría 2



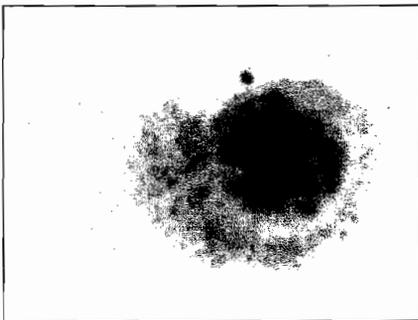
Categoría 3



Categoría 4



Categoría 5



Categoría 6

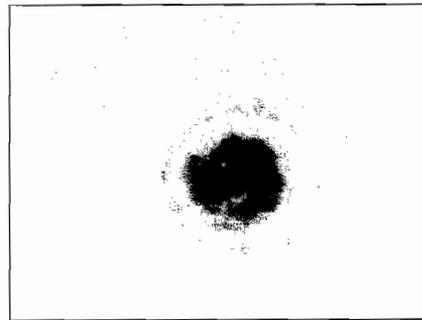


Figura 1. Categorías de ovocitos de bovino previa maduración *in vitro*
Figure 1. Bovine oocytes categories before *in vitro* maturation

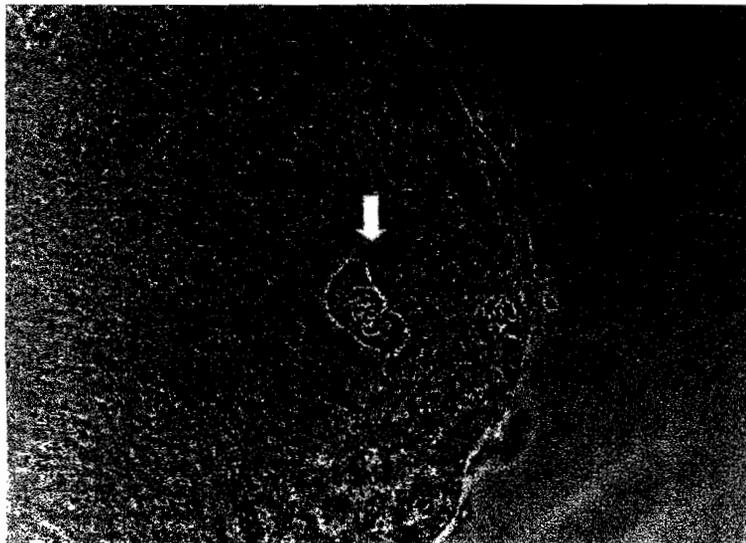
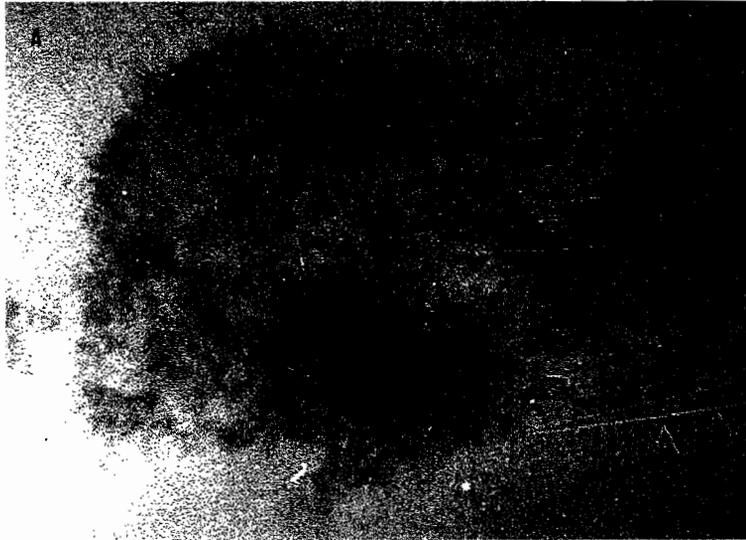


Figura 2.

- a) Ovocito madurado *in vitro* por 24 horas, evidencia mucificación de las células del cúmulo (aumento 400X)
- b) Ovocito madurado *in vitro* por 24 horas, al estado de segunda metafase, con restos del primer corpúsculo polar. Tinción aceto-orceína (aumento 500X)

Figure 2.

- a) Cummulus cell mucification of oocyte after 24 hours of *in vitro* maturation (400X)
- b) Metaphase II and first polar body of oocyte after 24 hours of *in vitro* maturation (500X)

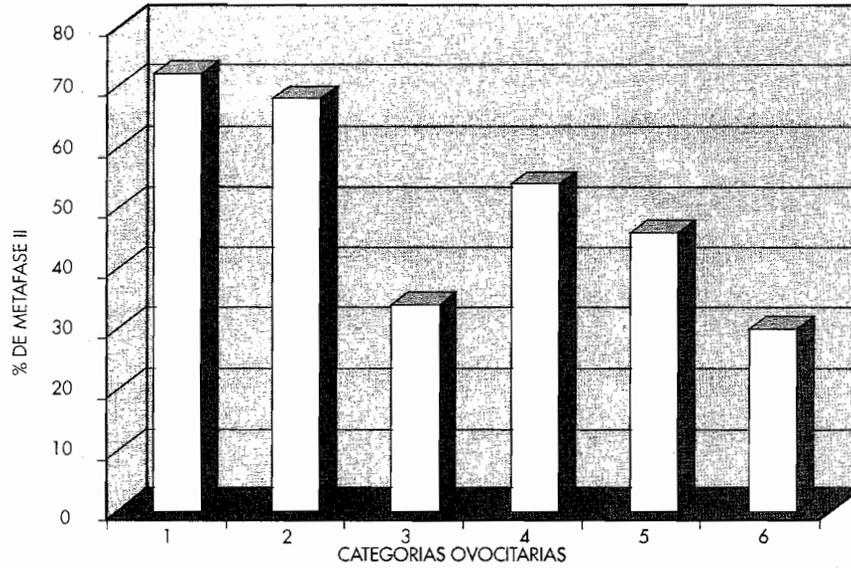


Figura 3.

Estado de metafase II (MII) alcanzado por las diferentes categorías de ovocitos de bovino

Figure 3. Second Metaphase (MII) in different bovine oocytes categories

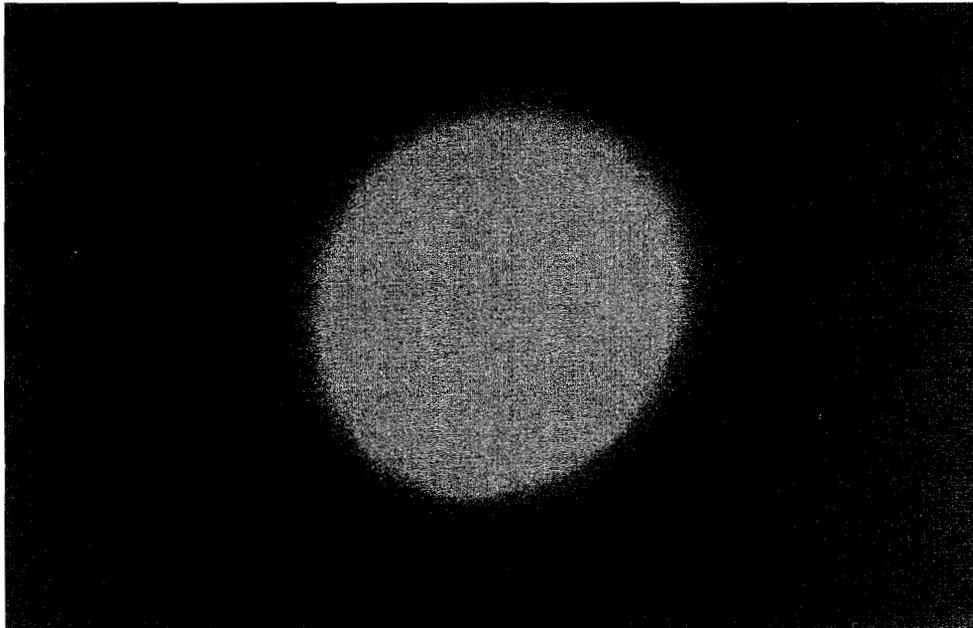


Figura 4.

Ovocito inmaduro de vaca teñido con FDA y observado al microscopio de epifluorescencia (400X).

La fluorescencia indica la viabilidad de la célula.

Figure 4.

Immatured bovine oocyte, FDA staining using epifluorescence microscope (400X).

Fluorescence shows cell viability

de las células del cúmulo, tuvieron los valores más bajos de maduración (34,9% y 31% respectivamente) en relación a las otras categorías ($p < 0,05$), sin encontrarse diferencias significativas respecto a los porcentajes de maduración en cultivo entre estos dos tipos de gametos ($p < 0,05$) (Cuadro 2). Los ovocitos de las categorías 2, 4 y 5 en cambio, obtuvieron los porcentajes intermedios de maduración ovocitaria (64,4%, 55,5% y 47,2% respectivamente), registrándose diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre estos valores (Cuadro 2).

La sobrevida de los ovocitos pre maduración, evaluada mediante la tinción FDA, mostró ovocitos viables, evidenciando fluorescencia a la observación con el microscopio (Figura 4). En este trabajo, se obtuvo 80,7% de viabilidad previo a la maduración y 77,1% post maduración *in vitro*.

DISCUSION

La disponibilidad de ovocitos viables y competentes para continuar el desarrollo, ha sido crítico para el progreso de la fecundación *in vitro*, como también para el cultivo de embriones y biotecnologías reproductivas asociadas. La posibilidad de seleccionar los ovocitos previo a su maduración, fue examinada en bovinos inicialmente por Leibfried y First (1979) y Leibfried y col. (1986), cuyos resultados demostraron que la capacidad de experimentar maduración nuclear *in vitro* no dependía del tamaño del folículo ni de la etapa del ciclo estral en que se encontraba la hembra, pero sí adquirirían importancia las características morfológicas de los gametos para su maduración en cultivo.

En este trabajo los ovocitos bovinos inmaduros en estado de vesícula germinativa (V.G), se categorizaron morfológicamente. La clasificación de los ovocitos a través del microscopio de disección, en base a características citoplasmáticas (homogeneidad) y cubiertas foliculares (células del cúmulo y de la corona radiada), pudieron utilizarse satisfactoriamente para seleccionar aquellos ovocitos inmaduros y relacionarlo a su capacidad de

maduración en cultivo. De acuerdo a ello, se obtuvieron los mejores resultados de maduración en los gametos que conservaban intactas sus cubiertas ovocitarias previo a la incubación y por el contrario, los porcentajes de maduración más bajos se observaron en aquellos que se encontraban desprovistos de las células del cúmulo. Estos resultados confirman lo descrito en otros estudios (Sirard y First, 1988; Madison y col., 1992), donde se señala que la remoción de todas las células de la corona y del cúmulo en bovinos, previo a la incubación *in vitro*, estaría relacionado a una posterior disminución del reinicio meiótico. La masa de células del cúmulo jugaría un rol importante en la regulación de la actividad del ovocito. Ovocitos porcinos desprovistos de las cubiertas ovocitarias, también presentan porcentajes bajos de maduración (Toyoda y col., 1992). La suplementación con células foliculares al cultivo de ovocitos inmaduros, compensa la falta de células somáticas durante la maduración, logrando un efecto positivo en el desarrollo embrionario posterior *in vivo* (Xu y col., 1987; Lu y col., 1989) e *in vitro* (Fukui y Ono, 1988; Younis y col., 1989; Fukui, 1990; Hyttel y col., 1997). La relación entre el ovocito y las células foliculares se modifica durante el período de maduración como resultado de cambios en la membrana del ovocito y el sistema de señales intercelulares (Thibault, 1977; Moor, 1990; Wassarman, 1994). Los ovocitos desnudos de las células del cúmulo serían incapaces de responder a la LH y FSH, ya que estas células son las mediadoras del efecto de las gonadotropinas sobre el huevo (Ball y col., 1983; 1984; Brackett y col., 1989; Zuelke y Brackett, 1990; Sirard y col., 1992); además, una comunicación extensa y directa entre las células foliculares y el ovocito facilitaría la producción de nutrientes y su transporte hacia el huevo (Moor, 1990).

La maduración de ovocitos de bovino ha sido estudiada mediante microscopía de luz y electrónica, bajo condiciones *in vivo* e *in vitro* (Hyttel y col., 1986; Xu y col., 1986; Suzuki y col., 1994). Estudios a nivel de la ultraestructura de los ovocitos de bovino muestran variaciones entre los ovocitos con cubierta folicular compacta y aquellos con una cubierta menos compactada. Estas diferencias se

manifestarían en las características citoplasmáticas, como son la distribución y organización de los diferentes organelos (de Loos y col., 1989). Sin embargo, a pesar de estas variaciones, estos investigadores encontraron diferencias en la competencia meiótica en sólo uno de los diferentes tipos de ovocitos madurados *in vitro*, lo que difiere con los resultados de este trabajo. No obstante lo anterior, esas diferencias a nivel ultraestructural encontradas por estos autores, podrían estar relacionadas a la capacidad de desarrollo posterior de los ovocitos.

Los ovocitos cuyos citoplasmas tenían características no homogéneas, presentando aspecto granular (categorías 4, 5 y 6), tuvieron porcentajes menores en la maduración nuclear respecto a aquellos ovocitos con el citoplasma homogéneo (categorías 1, 2 y 3). Estas diferencias que se observaron podrían estar relacionadas a procesos de atresia. Se ha descrito que los ovocitos de bovino provenientes de folículos atrésicos tendrían, entre otras características, menor homogeneidad en su citoplasma (Kruip y col., 1983; Leibfried y col., 1989), presentando una coloración más oscura que estaría relacionada a depósitos de lípidos y agrupación de organelos (de Loos y col., 1989). En trabajos previos, se señala que aproximadamente el 80% de los folículos presentes en un ovario de vaca, en cualquier momento del ciclo, estarían en proceso de atresia (Hazeleger y col. 1995). En el presente estudio se obtuvo un 77,2% de viabilidad celular posterior al cultivo y 56,4% de maduración nuclear (ovocitos en metafase II) considerando todos los ovocitos de las diferentes categorías, lo que indica un porcentaje menor de ovocitos atrésicos al momento de la maduración *in vitro*. No obstante, es posible que un porcentaje importante de ellos, especialmente aquellos desprovistos de las células del cúmulo, estuvieran iniciando un proceso degenerativo.

En el proceso de maduración normalmente el espacio entre las células del cúmulo aumenta, perdiéndose las uniones intercelulares debido al depósito de glicosaminoglicanos (principalmente ácido hialurónico) y piruvato a la matriz extracelular (Ball y col., 1983; 1984). Este fenómeno de expansión del cúmulo, conocido

como mucificación, al igual que el reinicio meiótico, pudieron ser inducidos *in vitro* durante la maduración en cultivo en las categorías de ovocitos que conservaron las células del cúmulo (categorías 1, 2 y 3). Factores importantes en la mucificación serían el aporte de la hormona folículo estimulante (FSH) al medio de maduración, la que estimula la síntesis de ácido hialurónico; el suero fetal bovino que retendría el ácido hialurónico en la matriz (Leibfried y col., 1986; Fenton y col., 1993; Kito y Bavister, 1997), como también factores solubles, aún no bien identificados bioquímicamente, producidos por los ovocitos y que iniciarían y estimularían la síntesis de ácido hialurónico (Kito y Bavister, 1997). Sin embargo, hay que considerar que la sola expansión y reinicio meiótico de los huevos no implica que sean funcionalmente maduros y aptos para ser fecundados.

Los datos de este trabajo confirman la gran variación en el aspecto de los ovocitos de vaca, previa maduración en cultivo, y la diferente capacidad de maduración *in vitro* de estos distintos tipos de ovocitos. Sin embargo, la influencia de estas diferencias en el proceso de maduración ovocitaria para el uso de la tecnología *in vitro*, sólo serían factibles de evaluar con la fecundación *in vitro* y desarrollo posterior de los embriones derivados de estos gametos.

RESUMEN

Este trabajo estudió la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos en relación a sus características morfológicas, previamente establecidas en un patrón no invasivo de clasificación. Se aspiraron folículos de 2 - 6 mm de ovarios de vacas de matadero. Los ovocitos se clasificaron en 6 categorías de acuerdo a las características citoplasmáticas y de las cubiertas ovocitarias mediante un microscopio estereoscópico: 1, ovocitos con citoplasma con granulado homogéneo y rodeado en su totalidad por una masa compacta de células del cúmulo; 2, ovocitos con citoplasma con granulado homogéneo y rodeado en forma parcial por células del cúmulo; 3, ovocitos con citoplasma con granulado homogéneo y desprovisto de células del cúmulo; 4, ovocitos con citoplasma polarizado y rodeado en su totalidad por células

del cúmulo; 5, ovocitos con citoplasma polarizado y rodeado en forma parcial por células del cúmulo; 6, ovocitos con citoplasma polarizado y desprovisto de células del cúmulo. Cada categoría se incubó en forma separada depositando 10 ovocitos por gota de 50 µl de medio TCM-199, suplementado por 24 horas a 39°C en aire con 5% de CO₂. La maduración de los ovocitos se evaluó con el microscopio de contraste de fases, observándose los estados de maduración nuclear: vesícula germinativa, desaparición de la envoltura nuclear, formación de placas metafásicas I y II y degeneración ovocitaria. Se estudió un total de 1206 ovocitos. Las categorías ovocitarias 1 y 2 fueron las que obtuvieron las mayores tasa de maduración *in vitro*, 75,3% y 68,6% respectivamente (p< 0,05). Las categorías 4 y 5 obtuvieron tasas de maduración de 55,5% y 47,2% respectivamente, no difiriendo entre ellas. Las categorías que obtuvieron las menores tasas de maduración en cultivo fueron la 3 y 6, con 34,95% y 30,97% respectivamente (p< 0,05), sin diferencias entre ambas. La viabilidad celular evaluada por FDA antes y después del cultivo fue de 80,7 y 77,15% respectivamente. Se concluye que la selección de los ovocitos previo a su cultivo, mediante técnicas no invasivas, incrementaría la tasa de maduración *in vitro*. En este sentido, un ovoplasma homogéneo y la presencia de varias capas compactas de células del cúmulo alrededor del ovocito, fueron las características morfológicas que más influyeron en la maduración ovocitaria.

REFERENCIAS

- BALL, G.D., L.M. LEIBFRIED, L.M. LENZ, R.W., AX, R.L., BAVISTER, B.D., FIRST, N.L. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Rep. 28:717-725.
- BALL, G.D., LEIBFRIED, L.M., AX, R.L., FIRST, N.L. 1984. Symposium: embryo development and manipulation. J. Dairy Sci. 67: 2775-2785.
- BARROS, C., QUINN, P., WHITTINGHAM, D. 1982. Relationship between sperm-oocyte fusion and fluorescein diacetate staining of hamster oocytes recovered from dead females. Arch. Biol. Med. Exp. 15: 49- 52.
- BARROS, C. 1987. Sperm chromatin decondensation after fertilization. Rev. Micr. Elec. Biol. Cell. 11: 15 - 26.
- BAVISTER, B.D., ROSE-HELLEKANT, T.A., PINYOPUMMINTER, T. 1992. Development of *in vitro* matured *in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined cultured media. Theriogenology 37: 127-146.
- BRACKETT, B., YOUNIS, G.A., FAYRER-HOSKEN, R.N. 1989. Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with high concentration of LH. Fertil. Steril. 52: 319-324.
- BRACKETT, B. G., ZUELKE, K.A. 1993. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. Theriogenology 39: 43-64.
- DE LOOS, F., VAN VLIET, C., VAN MAURIK, P., KRUIP, T.H. 1989. Morphology of immature bovine oocyte. Gamete Res. 24:197-204 .
- DE LOS REYES, M 1992. Estudio de la cinética de la liberación de acrosina durante la capacitación, reacción acrosómica y penetración de la zona pelúcida en bovinos. Tesis Magister. Fac. Medicina. Universidad de Chile.
- DE LOS REYES, M., ALMENDRA, C., BERLAND, M., DEL CAMPO, H., BARROS, C. 1996. Selección de espermatozoides de toro para fecundación *in vitro*. Arch. Med. Vet. 28: 31-38.
- DOWNS, S.M. 1993. Factor affecting the resumption of meiotic maturation in the mammalian oocyte. Theriogenology. 39: 65-79.
- FENTON, S.E., DENTINE, M.R., AX, R.L. 1993. Modulation of bovine oocyte-cumulus cell complex maturation and fertilization *in vitro* by glicosaminoglycans. J. Dairy Sci. 76: 701-712.
- FUKUI, Y. 1990. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. Mol. Reprod. Dev. 26: 40-46.

- FUKUI, Y., ONO, H. 1988. *In vitro* development to blastocyst of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes. Vet. Rec. 122: 282-288
- GOTO, Y., KAJIHARA, Y., KOSAKA, S., KOBAM., NAKANISHI, Y. 1988. Pregnancies after *in vitro* fertilization of cow follicular oocytes, their incubation *in vitro* and their transfer to the cow uterus. Theriogenology 29: 251-259.
- GOTO, Y., KAJIHARA, Y., KOBAM., KOSAKA, S., NAKANISHIOGAWA., K. 1989. *In vitro* fertilization and development of *in vitro* matured bovine follicular oocytes. J. Anim. Sci. 67: 2181-2185.
- GREVE, T., XU, KP., CALLESEN, H., HYTTEL, P. 1987. *In vivo* development of *in vitro* fertilized bovine oocytes matured *in vivo* versus *in vitro*. J. In Vitro Fert Embryo Transf. 4: 281 - 285.
- HANADA, A., NAGASE, H. 1981. Effects sperm preincubation in rabbit uterus and of imidazole on the penetration of zona-free hamster eggs by bull and board spermatozoa *in vitro*. J. Anim. Reprod. 25: 113-118.
- HAWK, H.W., NEL, N.D., WATERMAN, R.A., WALL, R.J. 1992. Investigation of means to improve rates of fertilization *in vitro* matured, *in vitro* fertilized bovine oocytes. Theriogenology 38: 989-998.
- HAZELEGER, N.I., HILL, D.J., STUBBINGS, R.B., WALTON J.S. 1995. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential *in vitro*. Theriogenology 43: 509-522.
- HYTTEL, P., XU, K.P., SMITH, S., GREVE, T. 1986. Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in cattle. J. Reprod. Fert. 78: 615 - 625.
- HYTTEL, P., FAIR, T., CALLESEN, H., GREVE, T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. Theriogenology 47: 23-32
- IM, K.S., PARK, R.W. 1995. Effects of epidermal growth factor on maturation, fertilization and development of bovine follicular oocytes. Theriogenology 44: 109 - 216.
- IRITANI, A., NIWA., K. 1977. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. J. Reprod. Fert. 50: 119-121.
- KIM, C.I., ELLINGTON, J.E., FOOTE, R.H. 1990. Maturation, fertilization and development of bovine oocytes *in vitro* using TCM 199 and a simple defined medium with co-culture. Theriogenology 33:433-440.
- KITO, S., BAVISTER, B.D. 1997. Gonadotropins, serum and amino acids alter nuclear maturation, cummulus expansion and oocytes morphology in hamster cumulus-oocytes complex *in vitro*. Biol. Reprod. 56: 1281-1289.
- KRUIP, T.A.M., CRAN, D.G., VAN BENEDEEN, T. 1983. Structural changes in bovine oocytes. Gamete Res. 8: 29- 47.
- LEIBFRIED, L., FIRST. N.L. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. J. Anim. Sc. 48: 76-83.
- LEIBFRIED, L., CRISTSER, E.S., FIRST, N.L. 1986. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocytes complexes. Biol. Reprod. 35:850-857.
- LEIBFRIED, L., CRISTSER, E.S., PARRISH, J.J., FIRST, N.L. 1989. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. Theriogenology 31: 61-74.
- LENZ, R. W., BALL, G.D., LEIBFRIED, M.L., AX, R.L., FIRST, N.L. 1983. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. Biol. Reprod. 29: 173-179.
- LIM, J.M., FUKUKI, Y., ONO, H. 1992. Developmental competence of bovine oocyte frozen at various maturation stages followed by *in vitro* maturation and fertilization. Theriogenology 37:351- 361.
- LONERGAN, P., KHATIR, H., CAROLAN, C., MERMILLOD, P. 1997. Bovine blastocyst production *in vitro* after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. J. Reprod. Fert. 109: 355-365.

- LU, K.H., GORDON, I., CHEN, H.B., GALLAGHER, M., McGOVERN, H. 1989. Birth of twins after transfer of embryos produced by *in vitro* techniques. *Vet. Rec.* 122: 539-540.
- MADISON, V., AVERY, B., GREVE, T. 1992. Selection of immature bovine oocytes for developmental *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 27:1-11.
- MOOR, R. M. 1990. Oocyte maturation. In: *Fertilization in mammals. Serono Symposia*, U.S.A. Bavister, B.J. Cummins, J. & Roldan, E.R. (eds.) pp. 1-4
- PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., WINER, A., FIRST, N.L. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38: 1171-1180.
- SHAMSUDDIN, M., LARSSON, B., GUBSTAFSSON, H., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 1993. *In vitro* development up to hatching of bovine *in vitro* matured and fertilized oocytes with or without support from somatic cells. *Theriogenology* 39:1067 - 1079.
- SIRARD, M. A., PARRISH, J.J., WARE, C.B., LEIBFRIED, L., FIRST, N.L. 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol. Reprod.* 39:545-552.
- SIRARD, M.A., FIRST, N.L. 1988. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol. Reprod.* 39: 229-234.
- SIRARD, M.A., COENEN, K., BILODEAU, S. 1992. Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology* 37: 39 - 57.
- SOKAL, R., ROHLF, J. 1981. Analysis of frequencies: In: *Biometry* (2^o Ed). W. Freeman and Company. U.S.A. pp 691-731.
- SUZUKI, H., YANG, X., FOOTE, R. 1994. Surface alterations of the bovine oocyte and its investments during and after maturation and fertilization *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 38:421-430.
- THIBAUT, C. 1977. Are follicular maturation and oocytes maturation independent process?. *J. Reprod. Fertil.* 51: 1-15.
- THIBAUT, C., SZÖLLÖSI, D., GÉRARD, M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reprod. Nutr. Dev.* 27: 865 - 896.
- TOYODA, Y., SATO, E., NAITO, K. 1992. Role of the cummulus oophorus in mammalian fertilization. *Biol. Reprod.* 83; 111-124
- WASSARMAN, P.M. 1994. The mammalian ovum. In: Knobil, E. and Neill, J. (eds.), *The Physiology of reproduction*. Raven Press, New York, pp. 69-103.
- XU, K.P., GREVE, T., SMITH, S., HYTTEL, P. 1986. Chronological changes of bovine follicular oocytes maturation *in vitro*. *Acta Vet. Scand.* 27: 505-519.
- XU, K.P., GREVE, T., CALLENSSEN, H., HYTTEL, P. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 81: 501 - 504.
- YOUNIS, A. Y., BRACKETT, B.G., FAYRER-HOSKEN, R.A. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation an fertilization *in vitro*. *Gamete Res.* 23:189-201.
- ZUELKE, K. A., BRACKETT, B.G. 1990. Luteinizing hormone enhanced *in vitro* development of *in vitro* fertilized bovine embryos. *Mol. Rep. Dev.* 31: 72 - 77.