

## MADURACIÓN *in vitro* DE OVOCITOS DE OVINO USANDO CONCENTRACIONES DE FSH+LH Y FSH EN MEDIO DE CULTIVO

F. Fernández Reyes\*, J.E. Hernández Pichardo\* y A.I. Pichardo Cruz\*\*

\*Laboratorio de Manejo de la Reproducción Animal. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X). Calzada del Hueso 1100, Colonia Villaquietud. Coyoacan 04960, México, D.F.;

\*\* Clínica privada, México, D.F.

**RESUMEN:** Con el objetivo de lograr la maduración *in vitro* de ovocitos ovinos, se obtuvieron ovarios a partir de ovinos sacrificados. Inmediatamente después del sacrificio los ovarios se sumergieron en solución salina fisiológica a 35°C. Se colectaron en total 242 ovarios y se debridaron 1294 folículos con un tamaño entre 2 a 6 mm de diámetro. Se seleccionaron 107 ovocitos que presentaron 3 ó más capas compactas de células del cúmulo y citoplasma homogéneo, después fueron cultivados en medio de maduración TCM 199 suplementado con FSH y LH en concentraciones: 1) 5 mg/mL de FSH y 5 mg/mL de LH (22 ovocitos), 2) 2.5 mg/mL de FSH y 2.5 mg/mL de LH (16 ovocitos), 3) 5 mg/mL de FSH (36 ovocitos), 4) 2.5 mg/mL de FSH (33 ovocitos). Posteriormente fueron fijados y evaluados mediante la tinción de orceína acética. Los resultados de la maduración indican que el grupo suplementado con 2.5 mg/mL FSH, obtuvo el mayor porcentaje (45.4%) de ovocitos en Metafase II, seguido por el grupo suplementado con 5 mg/ml FSH (27.7%), el grupo suplementado con 2.5 mg/mL FSH + 2.5 mg/mL LH (25%) y el grupo suplementado con 5 mg/mL FSH + 5 mg/mL LH (22.7%). No se observó diferencia estadística significativa entre los grupos ( $P < 0.05$ ). De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que el mejor medio para la maduración de ovocitos de ovino *in vitro* es TCM-199, suplementado con 2.5 mg/mL de FSH. La manipulación *in vitro* de ovocitos de ovino puede permitir el establecimiento de programas reproductivos en la época natural de empadre o fuera de ella y también se pueden establecer bancos de material genético para diversas aplicaciones.

(Palabras clave: maduración *in vitro*; ovocitos; ovino; FSH, LH)

---

### *In vitro* MATURATION OF BOVINE OOCYTES WITH FSH+LH AND FSH IN CULTURE MEDIUM

**ABSTRACT:** For *in vitro* maturation of ovine oocytes, ovaries from slaughtered hybrid animals were obtained. Immediately after slaughter, ovaries were placed on physiological saline solution at 35°C. A total of 242 ovaries was collected and 1294 follicles with a size between 2 to 6 mm in diameter were obtained. From them, 107 oocytes showing 3 or more compact layers of cumulus cells and homogenous cytoplasm were selected and cultivated in a maturation medium TCM 199 supplemented with FSH and LH in concentrations of: 1) 5mg/mL of FSH and 5mg/mL of LH (22 oocytes). 2) 2.5 mg/mL of each FSH and LH (16 oocytes). 3) 5mg/mL of FSH (36 oocytes), 4) 2.5 mg/mL of FSH (33 oocytes). Subsequently, they were fixed and evaluated by the acetic orceine staining. The maturation results indicate that the group supplemented with FSH 2.5 mg/mL, showed the highest percentage (45.4%) of Metaphase II oocytes, followed by the group supplemented with 5 mg/mL of FSH (27.7%) and the group supplemented with 2.5 mg/mL of FSH + 2.5mg/mL LH (22.7%). Significant statistic differences among the groups were not observed ( $P < 0.05$ ). According to these results, it is concluded that the best medium for the ovine oocytes *in vitro* maturation is TCM-99 supplemented with FSH 2.5 mg/mL. The *in vitro* manipulation of ovine oocytes may allow the establishment of reproductive programs in the natural crossing age period and also out of it. Genetic material banks for several applications may also be established.

(Key words: *in vitro* maturation; oocytes; ovine; FSH; L.H)

---

## INTRODUCCIÓN

La respuesta inadecuada al tratamiento hormonal y la falla en la fertilización en hembras con alta respuesta en la ovulación, son las limitaciones actuales en la producción *in vivo* de ovinos y cabras (6). La aplicación de nuevas tecnologías brinda la oportunidad de hacer la maduración *in vitro* de ovocitos de ovinos (1). Los recientes procedimientos en la producción de embriones y la tecnología de congelación, deben ser utilizadas para la creación de rebaños sin riesgos de transmisión de enfermedades y con disponibilidad de material genético de animales valiosos (6).

Se ha probado que la maduración *in vitro* de ovocitos es una técnica invaluable para la producción de un mayor número de embriones provenientes de animales de alto valor genético a un costo menor que con el empleo de las prácticas convencionales de superovulación y producción de embriones (20,21).

La habilidad del ovocito para madurar, fertilizarse y finalmente desarrollarse hasta embrión viable se adquiere gradualmente durante la progresiva diferenciación del mismo a través de la foliculogénesis. La maduración del ovocito solamente representa el final de este largo proceso y valida la preparación del mismo para conferir la capacidad del desarrollo final. Los aspectos citoplásmicos de la maduración de ovocitos son cruciales para la adquisición del desarrollo. Esta maduración citoplásmica puede activarse *in vitro* con el uso de suplementos en el medio de maduración como son el suero o fluido folicular, factor de crecimiento epidérmico, hormona del crecimiento, inhibina y activina (12).

Estudios previos han demostrado que la FSH ejerce una regulación bimodal de la función ovárica (3), con respuesta diferente según la concentración de FSH. Aunque se sugiere que en el cultivo *in vitro* una alta concentración de FSH produce una alta proporción de morulas, en el cultivo de ovocitos de bovino la producción óptima de blastocistos se obtuvo con una concentración submáxima (3). La adición de FSH en el medio de maduración *in vitro* incrementa en 50% el reinicio de la meiosis de los Complejos Ovocitos Células del Cúmulo (COCs), en comparación con complejos no estimulados o con adición de hCG en bovino (16). La FSH estimula el proceso de maduración del ovocito de ovino (10). Estudios realizados por Ali y Sirad (2), indican que el efecto de la FSH en la maduración nuclear y expansión de células depende de los substratos presentes en el medio de maduración.

La maduración del ovocito compromete dos procesos: primero la maduración nuclear, que involucra

la condensación del material nuclear seguido de la forma de los cromosomas por dos ciclos meioticos y segundo la maduración del citoplasma que compromete la redistribución de los organelos y la maduración. La maduración anormal del citoplasma en ovocitos de ovejas puede asociarse con un porcentaje reducido de formación de blastocistos, aún cuando la maduración nuclear ocurra (13).

En la maduración de ovocitos de ovino se han utilizado diversos tratamientos, entre ellos se encuentran el medio TCM199, Suero Fetal Bovino - Fetal Calf Serum (SFB - FCS), Suero de buey (SB), Células de la granulosa, Piruvato, Glutamina, HEPES, Bicarbonato, Penicilina, Estreptomycin, Gentamicina, Estradiol ( $E_2$ ), LH y FSH (Tabla 1).

El objetivo del presente trabajo es evaluar la maduración *in vitro* de ovocitos ovinos con el empleo de dos concentraciones de hormona Folículo estimulante (FSH) + hormona Luteinizante (LH) y dos concentraciones de FSH en el medio de cultivo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Fueron obtenidos 242 ovarios de ovinos híbridos sacrificados. El trabajo se realizó durante la época reproductiva y no reproductiva. Inmediatamente después del sacrificio los ovarios se sumergieron en solución salina fisiológica (0.9% de NaCl), a 35°C y se transportaron al Laboratorio Manejo de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, donde se lavaron 2 veces con solución salina a 37°C.

Los ovocitos se obtuvieron a partir del corte con una hoja de bisturí estéril de folículos de 2 a 6 mm de diámetro, posteriormente al corte del folículo se lavó con medio TCM- 199 suplementado con 100 UI/mL de heparina, 4 mg/mL de Gentamicina (10), y 25 mM de HEPES (13). El líquido folicular y el medio de lavado se recibieron en cajas de petri, el contenido de la caja reposó 15 minutos para permitir que las células se depositaran en el fondo, posteriormente se realizó la búsqueda de los complejos ovocitos células del cúmulo (COCs), en un microscopio invertido utilizando el objetivo 4X. Los ovocitos con 3 ó más capas de células del cúmulo y citoplasma homogéneo fueron cultivados (9).

El medio de maduración consistió en TCM 199 suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) inactivado por calor, 0.3 mM de piruvato (13), 1 mM de glucosa (2), y Penicilina 100 UI/mL, Estreptomycin 100 mg/mL, (5). Los medios de cultivo se esterilizaron a través de filtros con poros Millipore de 0.22 mm de diámetro y se equilibraron 24 horas antes de utili-

**TABLA 1.** Medios utilizados en la maduración *in vitro* de ovocitos de ovino y porcentaje de maduración./ *Media used in vitro maturation of ovine oocytes and maturation percentage*

Autor- Referencia	Medio de cultivo	Tiempo de cultivo	Porcentaje Metafase II
Wahid <i>et al.</i> (1992) (18)	1)TCM199 + SB 10%	24 horas	91
	2)TCM199 + SB 10% + 1-5 X 10 <sup>6</sup> Células de la granulosa/mL.		78
	3)TCM199 + SB 10% + FSH 10 µg/mL + LH 10 µg/mL + E <sub>2</sub> 1 µg/mL.		82
	4)TCM199 + SB 10% + 1-5 X 10 <sup>6</sup> Células de la granulosa/mL. + FSH 10 µg/mL + LH 10 µg/mL + E <sub>2</sub> 1 µg/mL.		82
O'Brien <i>et al.</i> (1996) (13)	1)TCM + HEPES 25 mM + Suero Fetal Bovino (FCS) 10% + Piruvato 0.3 mM + Glutamina 0.3 mM + FSH 10 µg/mL + LH µg/mL + E <sub>2</sub> 1µg/mL + Penicilina 125 UI/mL + Estreptomicina 38 UI/mL.	24 horas	100
Byrd <i>et al.</i> (1997) (5)	1)TCM199 + Bicarbonato 250 µL + Penicilina, Estreptomicina 1% + FCS 10% + FSH 5µg/mL + LH 5 µg/mL.	24 horas	72
Wang <i>et al.</i> (1998) (19)	1)TCM199 + FCS 10% + Penicilina 100 UI/mL + Estreptomicina 100 µg/mL + FSH 5µg/mL + LH 5µg/mL + E <sub>2</sub> 1.0 µg/mL.	27 horas	70
	2)TCM199 + FCS 10% + Penicilina 100 UI/mL + Estreptomicina 100 µg/mL + FSH 5µg/mL + LH 5µg/mL + E <sub>2</sub> 1.0 µg/mL + Potasio 100 UI/mL.		50
Guler <i>et al.</i> (2000) (10)	1)TCM199 + FSH 100 ng/mL.	24 horas	87
	2)TCM199 + IGF-I 100 ng/mL + FSH 100 ng/mL.		89
	3)TCM199 + FF 10% + FSH 100 ng/mL.		89
	4)TCM199 + EGF 10 ng/mL + FSH 100 ng/mL.		88
Ledda <i>et al.</i> (2001) (11)	1)TCM199 + FCS 10% + FSH 0.1 UI/mL + LH 0.1 UI/mL.	24 horas	83 a 87
Rao <i>et al.</i> (2002) (15)	1)TCM199 + FCS 10% + FSH 5µg/mL + LH 5µg/mL + Gentamicina 50 µg/mL.	24 horas	58
	2)TCM199 + FCS 10% + Gentamicina 50 µg/mL + BEF 20% + FSH 5µg/mL + LH 5µg/mL.		77
	3)TCM199 + FCS 10% + Gentamicina 50 µg/mL + OFF 20% + FSH 5µg/mL + LH 5µg/mL.		76
	4)TCM199 + FCS 10% + Gentamicina 50 µg/mL + ESS 20% + FSH 5µg/mL + LH 5µg/mL.		86

TCM199 = Medio de cultivo de Tejidos, SB = Suero de Buey, FSH = Hormona Folículo Estimulante, LH = Hormona Luteinizante, E<sub>2</sub> = Estradiol, FCS = Suero Fetal Bovino, IGF-I = Factor de Crecimiento Insulinico tipo I, FF = Fluido Folicular, EGF = Factor de Crecimiento Epidérmico, BEF = Fluido de embrión bovino, OFF= Fluido Folicular Ovino, ESS = Suero de Oveja en estro.

zarse en cajas de cultivo Nunc de cuatro pozos con gotas de 50 µL de medio de maduración cubiertas con aceite mineral, en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> a 38.5°C de temperatura. Para la maduración los ovocitos fueron incubados en estas mismas condiciones durante 22 horas (5).

El medio de maduración antes citado fue suplementado en cuatro concentraciones diferentes de FSH y LH:

- 1) 5 µg/mL de FSH + 5 µg/mL de LH
- 2) 2.5 µg/L de FSH + 2.5 µg/mL de LH
- 3) 5 µg/mL de FSH
- 4) 2.5 µg/L de FSH.

Una vez transcurrido el periodo de incubación, los ovocitos fueron denudados de las células del cúmulo (2) mediante pipeteo vigoroso y repetido con una

pipeta Pasteur, y se fijaron en una solución [3alcohol-ácido acético] durante 24 horas. Para diferenciar el material nuclear se tiñeron por capilaridad con una solución de orceína acética [1% de orceína en 45% de ácido acético]. Con el objetivo de determinar el estado de meiosis de los ovocitos, se examinaron en un microscopio de contraste de fases a 100X. Se tuvo en cuenta que los ovocitos inmaduros pueden tener presente la vesícula germinal (VG), rompimiento de la vesícula germinal (RVG) o cromosomas en Metafase I (MI). En los ovocitos maduros se pueden observar los cromosomas en metafase II (MII) y hay presencia del primer cuerpo polar (15).

Los resultados obtenidos se sometieron a análisis estadístico utilizando el método de  $X^2$ , (7).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2, la presencia de ovocitos con VG fue mayor en el grupo 2, con el 18.7% y menor que en el grupo 3 con 2.7%. El porcentaje de RVG fue de 5.5% en el grupo 3, mientras que el grupo 2 presentó 0%. En el caso de MI el mayor porcentaje se observa en el grupo 2 con el 37.5% y el menor en el grupo 1 con 4.5%. La MII resultó con mayor porcentaje en el grupo 4 con el 45.4% y el menor porcentaje lo obtuvo el grupo 1 con

22.7%. En el análisis estadístico no se observó diferencia significativa ( $P>0.05$ ) entre grupos por cada una de las categorías evaluadas. El número de ovocitos con degeneración se presentó en un alto porcentaje en el grupo 1 con el 59.0% y el más bajo en el grupo 2 con el 18.7%.

En todos los grupos se identificaron ovocitos inmaduros en diferentes proporciones, en el grupo 2 se obtuvo un 18.7% con presencia de VG, en el grupo 3 el porcentaje de RVG llegó a 5.5%, la presencia de ovocitos en MI fue mayor en el grupo 2, obteniendo el 37.5%, este último porcentaje resultó superior al 25% que obtuvo Ledda *et al.* (11), cuando cultivaron ovocitos sin suplemento de FSH-LH, pero fue inferior la proporción de ovocitos en MI obtenidos en los grupos 3 (19.4%), 4 (6.0%), 1 (4.5%) (Tabla 2).

Los resultados de la maduración indican que el grupo 4 suplementado con 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FSH, obtuvo el mayor porcentaje 45.4% de ovocitos en MII, seguido por el 27.7% del grupo 3 suplementado con 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FSH, el 25% del grupo 2 suplementado con 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FSH + 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LH y el 22.7% del grupo 1 suplementado con 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FSH + 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LH (Tabla 2). Estos resultados son inferiores al 58% reportado por Rao *et al.* (15), al utilizar una concentración de FSH 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y LH 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Todos los resultados de maduración obtenidos fueron inferiores al 84% reportado

**TABLA 2.** Número de ovocitos clasificados por grupo y estado de meiosis, después de ser cultivados./ *Number of oocytes classified by group and state of meiosis after being cultivated*

GRUPO	VG		RVG		MI		MII		DEG		TOTAL	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
<b>1</b> (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FSH +5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LH)	2/22	9.0 <sup>a</sup>	1/22	4.5 <sup>b</sup>	1/22	4.5 <sup>c</sup>	5/22	22.7 <sup>d</sup>	13/22	59.0 <sup>e</sup>	22	20.5
<b>2</b> (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FSH + 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LH)	3/16	18.7 <sup>a</sup>	0/16	0.0 <sup>b</sup>	6/16	37.5 <sup>c</sup>	4/16	25.0 <sup>d</sup>	3/16	18.7 <sup>e</sup>	16	14.9
<b>3</b> (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FSH)	1/36	2.7 <sup>a</sup>	2/36	5.5 <sup>b</sup>	7/36	19.4 <sup>c</sup>	10/36	27.7 <sup>d</sup>	16/36	44.4 <sup>e</sup>	36	33.6
<b>4</b> (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FSH)	1/33	3.0 <sup>a</sup>	1/33	3.0 <sup>b</sup>	2/33	6.0 <sup>c</sup>	15/33	45.4 <sup>d</sup>	14/33	42.4 <sup>e</sup>	33	30.8
<b>TOTAL</b>	7/107	6.5	4/107	3.7	16/107	14.9	34/107	31.7	46/107	42.9	107	100

VG= vesícula germinal. RVG: Rompimiento de la vesícula germinal. MI= Metafase I. MII= Metafase II. DEG= Degenerados.

Literales iguales en la misma columna indican que no se observó diferencia significativa ( $P>0.05$ ) entre los tratamientos y por estado de desarrollo tanto en valores absolutos como en valores relativos de la Metafase II.

por Ledda *et al.* (11), al utilizar 10 µg/mL de FSH-LH, asimismo fueron inferiores al 82% citado por Wahid *et al.* (18), quienes también utilizaron 10 µg/mL de FSH-LH para madurar ovocitos foliculares de ovino. Igualmente fueron inferiores al 70% mencionado por Wang *et al.* (19), quienes utilizaron 0.5 µg/mL de FSH y 0.5 µg/mL de LH. Por otra parte Guler *et al.* (10), al utilizar 100 ng/ml de FSH y 100 ng/mL de LH obtuvieron el 87% de maduración, siendo este porcentaje mayor al obtenido en el presente estudio.

Wahid *et al.* (18), reportan el 91% de ovocitos en MII después de la maduración *in vitro* sin utilizar hormonas para la maduración, sin embargo cuando adicionaron 10 µg/mL de FSH y 10 µg/mL de LH junto con otros tratamientos, el porcentaje de maduración fue de 78% a 82%. Asimismo Byrd *et al.* (5), obtuvieron el 72% de maduración al utilizar 5 µg/mL de FSH y 5 µg/mL de LH. En tanto que O'Brien *et al.* (13), observaron el 100% de ovocitos madurados al utilizar 10 µg/mL de FSH y 10 µg/mL de LH, además de adicionar 0.3 mM de Piruvato, 0.3 mM de Glutamina y 1 µg/mL de Estradiol. Estos resultados son diferentes a los obtenidos en el presente estudio a pesar de que se adicionó al medio de cultivo 1 mM de glucosa y 0.3 mM de Piruvato. Lo anterior indica que debe haber factores inespecíficos que pueden generar variación en los resultados de cada ensayo en particular.

En bovinos con el empleo de una concentración de 0.2 ng/mL de FSH en medio TCM 199, Tomesi *et al.* (17), obtuvieron 69% de ovocitos en MII, una dosis menor a la utilizada en los grupos 3 y 4 suplementados con 5 µg/mL FSH y 2.5 µg/mL FSH respectivamente, la diferencia posiblemente se debe a que utilizaron ovocitos de bovino y el medio fue suplementado con suero de buey.

En el presente estudio muchos ovocitos degeneraron durante el periodo de cultivo, el porcentaje por grupo fue: 1, (59.0%); 2, (18.7%); 3, (44.4%); 4, (42.4%) (Tabla 2). Estos porcentajes resultaron muy superiores al 13.6% de ovocitos de ovino degenerados obtenido por Wang *et al.* (19), al utilizar 0.5 µg/mL de FSH y 0.5 µg/mL de LH. Esta degeneración se puede deber a los requerimientos que tienen los ovocitos para su maduración *in vitro*, entre ellos se encuentra; que el medio de cultivo debe ser una solución balanceada, con oxígeno, iones de bicarbonato, proteínas, aminoácidos, fuentes de energía y varios aditivos con un pH de 7.4 (14).

En el proceso de maduración de los ovocitos el piruvato de sodio es un promotor de la maduración nuclear y junto con la presencia de células del cúmulo es importante para el desarrollo posterior de cigotos

y blastocistos (8). Un abastecimiento adecuado de glucosa es importante durante la maduración *in vitro*. La adición de glucosa al medio de maduración mejora la reanudación de la meiosis, la segmentación embrionaria y la producción de mórulas y blastocistos en bovinos (16). Por otro lado Cha *et al.* en 1991; citados por Wani (20), reportaron una acción estimulante del líquido folicular ovino sobre la maduración *in vitro* de ovocitos, debido probablemente a las hormonas esteroides, gonadotropinas y factores de crecimiento, incluyendo el Factor de Crecimiento Insulinico (IGF) y Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), contenidos en el líquido folicular. La elevada proporción de ovocitos degenerados y la baja proporción en la maduración obtenida pudo deberse a la ausencia en el medio de maduración de factores de crecimiento, ya que el medio de maduración contenía fuentes energéticas como el piruvato y la glucosa.

Los resultados que obtuvo Wani *et al.* (22), indican que la edad de las hembras tiene efecto significativo en la cantidad y calidad de los ovocitos obtenidos, sus estudios indican que los ovocitos provenientes de ovejas menores de 1 año de edad resultaron de menor calidad que los de ovejas entre 1 y 3 años (53.8% de ovocitos de buena calidad contra 55.4%, respectivamente). También Ledda *et al.* (10), observaron que los folículos presente en ovarios de hembras jóvenes son más pequeños. Bartlewski *et al.* (4), reportan una relación inversa entre el inicio del anestro y durante el anestro en el tamaño de los folículos antrales desarrollados. O'Brien *et al.* (13) demostraron que los ovocitos obtenidos de hembras adultas presentan mayor capacidad para desarrollar hasta blastocisto que aquellos obtenidos de hembras jóvenes cuando se lleva a cabo la maduración *in vitro* (24.6% contra 7.4% respectivamente). Aunque en el presente estudio no se registró la edad de las hembras, esta puede ser otra causa de la baja proporción que se obtuvo en la maduración.

## CONCLUSIONES

El mejor medio de maduración *in vitro* de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo es TCM-199, suplementado con 2.5 µg/mL FSH, por haber obtenido el mayor porcentaje de maduración 45.4%.

El número de ovocitos degenerados se presentó en un alto porcentaje 59.0%, al suplementar el TCM-199 con 5 µg/mL FSH + 5 µg/mL LH.

La elevada proporción de ovocitos degenerados y la baja proporción en la maduración *in vitro* sugieren el uso de factor de crecimiento.

## REFERENCIAS

1. Accardo, C.; Dattena, M.; Pilichi, S.; Mara, L.; Chessa, B.; Coppai, P. (2004): Effect of recombinant human FSH and LH on *in vitro* maturation of sheep oocytes; embryo development and viability. *Anim. Reprod. Sci.* 81: 77-86.
2. Ali, A. y Sirard, M.A. (2002): Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *In vitro* Maturation. *Biol.Reprod.* 66: 901-905.
3. Barañao, J.L. y Salamone, D.F. (1995): *In vitro* effects of different doses of FSH on oocyte maturation and embryo development. *Theriogenology.* 43:164- 164.
4. Bartlewski, P.M.; Vanderpol, J.; Berad, A.P.; Cook, S.J.; Rawlings, N.C. (2000): Ovarian antral follicular dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotropins and ovarian steroids in anoestrous Finnish Landrace ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 58: 273-291.
5. Byrd, S.R.; Flores-Foxworth, G.; Applewhite, A.A.; Westhusin, M.E. (1997): *In vitro* maturation of ovine oocytes in a portable incubator. *Theriogenology.* 47: 857-864.
6. Cognie, Y.; Baril, G. ; Poulin, N. ; Mermillod, P. (2003) : Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology.* 59: 171-188.
7. Daniel, W.W. (1982): Bioestadística bases para el análisis de las ciencias de la salud. Limusa. México, D.F.
8. Geshi, M. ; Tekenouchi, N. ; Yamauchi, N. ; Nagai, T. (2000) : Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium, fertilization and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biol. Reprod.* 63:1730-1734.
9. Gordon, I. (1994): Laboratory Production of Cattle Embryos. CAB International; Cambridge, United Kingdom, pp 30-137.
10. Guler, A. ; Poulin, N. ; Mermillod, P. ; Terqui, M. ; Cogié, Y. (1998) : Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. *Theriogenology.* 54: 209-218.
11. Ledda, S.; Bogliolo, L.; Laoni, G.; Naitana, S. (2001): Cell coupling and Maturation- Promoting Factor activity in *In vitro*- matured prepubertal and adult sheep oocytes. *Biol. Reprod.* 65:247- 252.
12. Mermillod, P.; Oussaid, B.; Cognie, Y. (1999): Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potencial of embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54: 449-460.
13. O'Brien, J.K.; Dwyer, D.; Ryan, J.P.; Maxwell, W.M.C.; Evans, G. (1996): Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. *Reprod. Fertil. Devel.* 8: 1029-1037.
14. Picton, H.M.; Danfour, M.A.; Harris, S.E.; Chambers, E.L.; Huntriss, J. (2003): Growth and maturation of oocytes *in vitro*. *Reproduction supplement.* 61: 445-462.
15. Rao, B.S.; Naidu, K.S.; Amarnath, D.; Vagdevi, R.; Rao, A.S.; Brahmaiah, K.V.; Rao, V.H. (2002): *In vitro* maturation of sheep oocytes in different media during breeding and non-breeding seasons. *Small Ruminant Res.* 43: 31-36.
16. Sutton, M.L.; Gilchrist, R.B.; Thompson, J.G. (2003): Effects of *in-vivo* and *in-vitro* environments in the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction Update.* 9: 35- 48.
17. Tomesi, M.B.; Salamone, D.; Archer, J. (1995): *In vitro* maturation of bovine oocytes in serum- free medium. *Theriogenology.* 43: 339-339.
18. Wahid, H.; Monaghan, P.; Gordon, I. (1992): *In vitro* maturation (IVM) of the sheep follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, Abstract Series 9:51 (Abs 89).
19. Wang, S.; Liu, Y.; Holyoak, G.R.; Evans, R.C.; Bunch, T.D. (1998): A protocol for *in vitro* maturation and fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant Res.* 29: 83-88.
20. Wani, N.A. (2002): *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant Res.* 44: 89- 95.
21. Wani, N.A.; Wani, G.M.; Khan, M.Z.; Salahudun, S. (2000): Effect of oocytes harvesting techniques on *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization in sheep. *Small Ruminant Res.* 36: 63-67.
22. Wani, N.A.; Wani, G.M.; Khan, M.Z.; Sidiqi, M.A. (1999): Effect of different factors on the recovery rate of oocytes for *in vitro* fertilization procedures in sheep. *Small Ruminant Res.* 34: 71-76.

(Recibido 10-12-2006; Aceptado 3-4-2007)