

# EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS BOVINOS SOBRE LA PROGRESIÓN MEIÓTICA. NOTA TÉCNICA

## Effect of Time of *in vitro* Maturation of Bovine Oocytes on the Meiotic Progression. Technical Note

Julio A. Landínez Aponte<sup>1,3,4</sup>, Patricia C. Villamediana<sup>2</sup>, Hugo J. Hernández Fonseca<sup>1\*</sup> y Eleazar Soto Belloso<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Fecundación *in vitro*, Unidad de investigación en Biotecnología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias.

<sup>2</sup>Laboratorio de Citogenética, Unidad de Investigación en Biotecnología Animal, Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo 4505-A, Venezuela.

<sup>3</sup>Postgrado en Producción Animal, Facultades de Agronomía y Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. Maracay.

<sup>4</sup>Empresa GENICA. Maracaibo, Venezuela. <sup>5</sup>Venezolana de Inseminación Artificial y Trasplante de Embriones (VIATECA)

\*E-mail: hjhernan@cantv.net

### RESUMEN

El objetivo de este estudio fue investigar el efecto de la duración de la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos sobre la progresión meiótica. Para ello se utilizaron complejos ovocito cumulus (COC) obtenidos a partir de ovarios de hembras sacrificadas y colocados a madurar en medio TCM 199 suplementado con 10 µg/mL de FSH (Folltropin-V<sup>®</sup>), 1 µg/mL 17 β estradiol, 50 ng/mL de factor de crecimiento epidermal y 10% de suero fetal bovino, a 38,5°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> en aire saturado de humedad, durante 23 a 27 horas. Los ovocitos fueron despojados de las células del cumulus y fijados en una solución de metanol: ácido acético (3:1) y teñidos con aceto-orceína (1,1%) para evaluar la progresión meiótica. Tras 23 horas de cultivo, la tasa de maduración ovocitaria alcanzó un 59,71%, valor que se elevó hasta un 83% a las 26 horas de cultivo, disminuyendo luego a un 56,25% a las 27h. La proporción de ovocitos degenerados tras el cultivo *in vitro* también se incrementó con el aumento en la duración de la maduración ovocitaria de un 0% a las 23 horas hasta un 10,41% a las 27 horas. En este estudio, se encontró que la competencia para el desarrollo de ovocitos bovinos se ve afectada por la duración de la maduración *in vitro*.

**Palabras clave:** Ovocito, maduración *in vitro* (MIV), progresión meiótica, bovino.

### ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of the duration of *in vitro* maturation of bovine oocytes on meiotic progression. To do this cumulus oocyte complexes (COC) were obtained from ovaries of female animals slaughtered, COC were set to mature in TCM 199 supplemented with 10 µg/mL of FSH (Folltropin-V<sup>®</sup>), 1 µg/mL 17 β estradiol, 50 ng/mL of epidermal growth factor and 10% fetal bovine serum, at 38.5°C in 5% CO<sub>2</sub> in humidity saturated air during 23 to 27 hours. COC were stripped from cumulus cells and fixed in a solution of methanol: acetic acid (3:1) and stained with aceto-orcein (1.1%) to evaluate meiotic progression. After 23 hours, the rate of maturation reached 59.71%, a value which rose to 83% at 26 hours and then declined to 56.25% at 27h. The proportion of degenerated oocytes after culture *in vitro* also increased with increased duration of maturation time from 0% at 23 hours, and up to 10.41% at 27 hours. This study found that development competence of bovine oocytes is affected by the duration of maturation *in vitro*.

**Key words:** Oocyte, *in vitro* maturation (MIV), meiotic progression, bovine.

### INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años la aplicación de técnicas *in vitro* para producción de embriones se ha incrementado exitosamente [1]. Sin embargo, los embriones producidos *in vitro* difieren de su contraparte *in vivo* en muchos aspectos, como por ejemplo la capacidad de desarrollo, morfología, resistencia a la

congelación y supervivencia después de la transferencia [9, 13, 23, 30, 39, 40].

La capacidad de un ovocito maduro para superar las etapas de fecundación, el desarrollo del embrión preimplantacional y la implantación es denominada capacidad de desarrollo del ovocito y es una medida intrínseca de la calidad del mismo [20]. Los ovocitos madurados *in vitro* poseen baja competencia de desarrollo comparados con los ovocitos madurados *in vivo* en parte debido al inadecuado ambiente *in vitro* que apoya el completo desarrollo de la maduración [14, 15, 34, 38].

La adquisición de la capacidad de desarrollo por parte de los ovocitos madurados *in vitro* es un factor limitante para que se puedan alcanzar con éxito las fases de fecundación, división y desarrollo embrionario [11]. Esta diferenciación de los ovocitos es orquestada por una interacción compleja entre factores de crecimiento y citoquinas que permiten la maduración nuclear y citoplasmática [3, 4].

La maduración *in vitro* de ovocitos bovinos es afectada por muchos factores, como el tiempo y la temperatura de transporte desde el matadero hasta el laboratorio [31], el tamaño del folículo [24, 32], la etapa de desarrollo del ovocito [16], el diámetro del ovocito [21], la composición del medio [25], el tiempo de maduración [31], las hormonas [35, 45] y los sueros [31]. Un tiempo inapropiado de maduración puede permitir la formación anormal de la cromatina [8], el envejecimiento del ovocito [18] y un desarrollo comprometido del mismo [31].

Durante la maduración *in vitro*, la extrusión del primer corpúsculo polar indica el éxito de la maduración, alcanzando el estadio de metafase II, que ocurre durante las 18-24 horas después de comenzar la maduración. Existe la evidencia de que algunos ovocitos maduran rápidamente, observándose el primer corpúsculo polar a las 16 horas. Sin embargo, un período de cultivo es necesario antes de la fecundación, para que se pueda alcanzar la capacidad de desarrollo del ovocito [7, 21, 25, 42]. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del tiempo de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos sobre la progresión meiótica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención y selección de ovocitos

Se utilizaron ovarios de vacas mestizas, sacrificadas en mataderos comerciales, ubicados en la Villa del Rosario, estado Zulia, Venezuela, los cuales se transportaron al laboratorio en solución buffer fosfato (PBS) a una temperatura de entre 35 y 37°C en un contenedor isotérmico en un lapso aproximado de 3 horas posterior al sacrificio. Posteriormente, los ovarios fueron lavados con PBS + 50 mg/L de gentamicina a 35-37°C. Folículos ováricos entre 2 y 8 mm de diámetro fueron aspirados con una aguja de 18 G unida a una jeringa de 10 mL. Se seleccionaron los ovocitos que presentaron un mayor tamaño,

citoplasma homogéneo y al menos una capa completa de células del cúmulus compacta [41].

### Maduración *in vitro* de ovocitos

Una vez seleccionados los complejos ovocito-cúmulus (COCs), éstos se cultivaron en grupos de 50 en platos de cultivo de 4 celdas contentivos de 250 µL del medio de cultivo tisular 199 (TCM-199, M-7528, Sigma) suplementado con 275 mg/L de piruvato sódico (P-5280, Sigma), 50 mg/L de gentamicina, 146 mg/L de L-glutamina (G-15120, Sigma), 10 µg/mL de Folltropin-V® (Vetrepharm, Canadá Inc), 1 µg/mL de 17β-estradiol (E-8875, Sigma), factor de crecimiento epidermal (50 ng/mL) y 10% suero fetal bovino (SFB, F-2442, Sigma), a 38,5°C en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> en aire saturado de humedad [28].

### Tiempo de maduración y evaluación de la progresión meiótica

Una vez iniciada la maduración, los COC se maduraron durante 23 a 27 horas. Para evaluar la progresión meiótica, los ovocitos fueron desnudados de las células del cumulus mediante agitación mecánica, luego se fijaron en una mezcla de metanol ácido-acético en proporción 3:1 durante al menos 24 horas a 4°C. Posteriormente se procedió a teñirlos con aceto-orceína al 1,1%. Una vez teñidos los ovocitos se evaluó la maduración nuclear de los mismos bajo microscopio óptico (400x, Olympus, BX40, Japón), clasificándolos, según el estadio meiótico alcanzado en: ovocitos maduros (MII + CP: metafase II + corpúsculo polar, Telol: telofase I), ovocitos inmaduros (VG: vesícula germinal; CCII: condensación cromosómica II; MI: metafase I y Anal: anafase I) y ovocitos con material nuclear degenerado [41].

### Análisis estadístico

Se consideraron como ovocitos maduros, aquellos que al culminar el tiempo de maduración alcanzaron el estadio de metafase II (MII) o telofase I (Telo I) y que no mostraron signos de degeneración y ovocitos degenerados los que muestren anomalías en el material nuclear [37].

Las tasas de maduración (proporción de ovocitos totalmente madurados, con relación al total) fueron analizadas aplicando un procedimiento Proc Logistic del paquete estadístico SAS®, considerando diferencias estadísticamente significativas cuando P < 0,05 [37].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La capacidad de desarrollo de un ovocito ha sido definida por First y col. [12] como la capacidad de reiniciar y completar la meiosis, de dirigir la fecundación y de iniciar los eventos que resultan en el desarrollo embrionario. Durante la maduración *in vitro* son muchos los factores que pudieran estar afectando la capacidad de desarrollo de los ovocitos bovinos

[17, 24, 35]. Cualquier mejora que se haga en esta etapa incrementará el éxito en las fases subsiguientes.

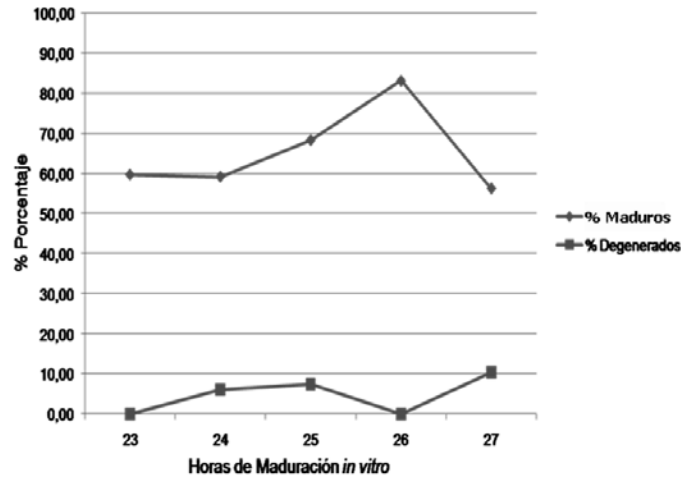
En el presente estudio se evaluó la progresión meiótica de un total de 512 ovocitos que fueron madurados durante 23 a 27 horas. En la TABLA I se muestran los resultados obtenidos tras la maduración *in vitro*, agrupados en  $\leq 24$  y  $>24$  horas de maduración. La tasa promedio de maduración ovocitaria alcanzada fue de 67,8%, observándose un 4,0% de ovocitos degenerados al final de la maduración *in vitro* (MIV). Estos resultados indican que, el sistema de MIV utilizado soporta adecuadamente la maduración nuclear de ovocitos bovinos.

Se han publicado resultados diversos en relación a la progresión meiótica de ovocitos MIV, encontrándose en la literatura que las tasas de maduración oscilan entre un 50% y un 80%. Martino y col. [29] obtuvieron un porcentaje de maduración de 56,9% por medio de la técnica de *slicing*. Hurtt y col. [19], obtuvieron un porcentaje de 77% y Luna y col. [27], obtuvieron una tasa de 80,3%. El éxito limitado de la tasa de maduración obtenida en el presente trabajo, puede ser atribuido a las imperfecciones en el medio de cultivo utilizado para la maduración ovocitaria. Tal cual se deduce de los estudios de Van de Leemput y col. (1996) citado por Izadyar y col. [22], los cuales concluyeron que las condiciones *in vitro* no llegan a ser completamente adecuadas para un desarrollo óptimo.

*In vivo*, los ovocitos bovinos alcanzan la maduración final en el periodo entre el pico de LH y la ovulación, aproximadamente 30 h después del pico de LH. Sin embargo, la maduración nuclear del ovocito (desarrollo a metafase II) pareciera acelerarse *in vitro*: 24h son suficientes para la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos obtenidos de folículos antrales [13].

En el presente trabajo, tras 23 horas de cultivo, la tasa de maduración ovocitaria alcanzó un 59,71%, valor que se elevó hasta un 83% a las 26 horas de cultivo, disminuyendo luego a un 56,25% a las 27h. La proporción de ovocitos degenerados tras el cultivo *in vitro* también se incrementó con el aumento en la duración de la maduración ovocitaria, de un 0% a las 23 horas hasta un 10,41% a las 27 horas (FIG. 1).

Cuando la maduración ovocitaria tuvo una duración de 24 horas o menos, la proporción de ovocitos que fueron clasificados como maduros fue de 59,49% y la de ovocitos degenerados de un 2,53%. En el grupo experimental en el que la du-



**FIGURA 1. PORCENTAJE DE OVOCITOS BOVINOS EN METAFASE II Y DEGENERADOS DURANTE DIFERENTES HORAS DE MADURACIÓN *IN VITRO* / PERCENTAGE OF BOVINE OOCYTES AT METAPHASE II AND DEGENERATE DIFFERENT TIMES DURING *IN VITRO* MATURATION.**

ración de la MIV fue mayor a 24h, la proporción de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II + corpúsculo polar (MII+CP) fue de 72% y la tasa de degeneración de un 5,09%. La proporción de ovocitos en metafase II aumenta significativamente ( $P < 0,05$ ) con el incremento en el tiempo de cultivo, no así la tasa de degeneración.

Yadav y col. [44] estudiaron la maduración *in vitro* de ovocitos de cabra (*Capra hircus*) en medio TCM199 suplementado con suero de vaca en celo y hallaron que al inicio del cultivo (0 h) la mayoría de los ovocitos se encontraban en el estadio de vesícula germinal (VG). En dicho estudio la rotura de la membrana de la VG se iniciaba dentro de las primeras 6 h de cultivo y muchos de los ovocitos completaban este estadio a las 16 h de cultivo. La consiguiente condensación de cromosomas daba lugar a la metafase I (MI) entre las 12 a 20 h seguida del estadio de MII a las 22 a 36 h, con el número mayor de ovocitos alcanzando el estado de MII a las 30 h.

Estudios recientes describen una amplia variación en el tiempo requerido para completar la meiosis *in vitro*, variando desde las 24 hasta las 32 h [5, 6, 39]. Martino y col. [29], estudiando la competencia de desarrollo de ovocitos de cabra ob-

**TABLA I**  
**TASA DE MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS MADURADOS *IN VITRO* DURANTE DIFERENTES HORAS DE MADURACIÓN / RATE OF MATURATION OF BOVINE OOCYTES MATURED *IN VITRO* FOR DIFFERENT TIMES OF MATURATION**

Tratamiento	Nº Total de Ovocitos	Nº Ovocitos		
		Maduros (%)	Inmaduros	Degenerados (%)
$\leq 24$	237	141 (59,49) <sup>a</sup>	90 (37,98) <sup>a</sup>	6 (2,53) <sup>a</sup>
$> 24$	275	198 (72) <sup>b</sup>	63 (22,91) <sup>a</sup>	14 (5,09) <sup>a</sup>

Maduros: ovocitos que alcanzaron un estadio de metafase II + corpúsculo polar o telofase I. Inmaduros: ovocitos que presentaron un estadio de vesícula germinal, condensación cromosómica II, metafase I y anafase I.

Letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

servaron un aumento significativo en la proporción de ovocitos en MII+CP con el incremento correspondiente en el tiempo de cultivo de 24 a 27h. Son y col. [36], demuestran que la capacidad de desarrollo de ovocitos colectados luego de un tratamiento con gonadotropina corionica humana (hCG) en un programa de MIV humana, se correlaciona con el tiempo de maduración. También observaron una relación significativa entre el potencial de desarrollo embrionario y la duración en alcanzar el estadio de MII.

Se afirma que la baja competencia para el desarrollo de embriones derivados de ovocitos madurados lentamente, puede ser debida a una pérdida en la actividad del factor promotor de la fase M, en la producción de ciclinas y otras proteínas que controlan el ciclo celular. La asincronía en el tiempo de maduración puede ser debida a diferencias intrínsecas de los ovocitos recuperados de folículos de tamaños diferentes. Se sabe que el diámetro folicular tiene una influencia clara sobre la competencia para el desarrollo de ovocitos de ratón (*Mus spp.*) y de ganado bovino [2, 10, 26, 33, 43]. En el presente estudio, este factor pudiese ejercer un efecto negativo sobre la tasa de maduración, debido a que los ovocitos obtenidos por medio de la técnica de *slicing* se encontraban en folículos de diferentes diámetros (2-8 mm).

## CONCLUSIONES

La competencia para el desarrollo de ovocitos bovinos se ve afectada por la duración de la maduración *in vitro*. Una forma mas definitiva de evaluar este efecto debería ser el análisis de la capacidad de desarrollo de los embriones derivados de ovocitos así madurados y fecundados *in vitro* y cultivados hasta el estadio de blastocito.

## AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia y a la empresa GENICA por el financiamiento de esta investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BALASUBRAMANIAN, S.; RHO, G. Effect of cysteamine supplementation of *in vitro* matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. **Anim Reprod Sci.** 98: 282-292. 2007.
- [2] BARNES, F.L.; KAUSCHE, A.; TIGLIAS, J.; WOOD, C.; WILTON, L.; TROUNSON, A. Production of embryos from in-vitro matured primary human oocytes. **Fertil Steril.** 65: 1151-1156. 1996.
- [3] BLONDIN, P.; SIRARD, M. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.** 41: 54-62. 1995.
- [4] BOELHAUVE, M.; SINOWATZ, F.; WOLF, E.; PAULA-LOPES, F. Maturation of Bovine Oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of *in vitro*-produced blastocysts. **Biol of Reprod.** 73: 737-744. 2005.
- [5] CHAUHAN, M.S.; ANAND, S.R. *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. **Ind J Exp Biol.** 29: 105-110. 1991.
- [6] CROZET, N.; AHMED-ALI, M.; DUBOS, M.P. Developmental competence of goat oocyte from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. **J Reprod Fertil.** 103: 293-298. 1995.
- [7] DOMINKO, T.; FIRST, N. Kinetics of bovine oocyte maturation allows selection for developmental competence and is affected by gonadotropins. **Theriogenol.** 37: 203. 1992. (Abstract).
- [8] DOMINKO, T.; FIRST, N.L. Timing of meiotic progression in bovine oocyte and its effect on early embryo development. **Mol. Reprod. Dev.** 47: 456-467. 1997.
- [9] DONNAY, I.; AUQUIER, P.; KAIDI, S.; CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; MERMILLOD, P.; MASSIP, A. Vitrification of *in vitro* produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. **Anim Reprod Sci.** 52: 93-104. 1998.
- [10] EPPIG, J.J.; SCHROEDER, A.C.; O'BRIEN, M.J. Developmental capacity of mouse oocytes matured *in vitro*: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. **J Reprod Fertil.** 95:119-127. 1992.
- [11] EPPIG, J.; SCHULTZ, R.; O'BRIEN, M.; CHESNEL, F. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. **Dev. Biol.** 164: 1-9. 1994.
- [12] FIRST, N.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.; SIRARD, M. Cytoplasmic control of oocyte maturation and species differences in the development of maturational competence. In: **Meiotic Inhibition: Molecular Control of Meiosis.** F.P. Haseltine and N.L. First, (Eds). Alan R. Liss, Inc., New York, NY. 1-46. 1988.
- [13] GLIEDT, D. W.; ROSENKRANS, C. F.; RORIE, R. W.; RAKES, J. M. Effects of oocyte maturation length, sperm capacitation time and heparin on bovine embryo development. **J Dairy Sci.** 79:532-535. 1996.
- [14] GREVE, T.; AVERY, B.; CALLESEN, H. Viability of *in vivo* and *in vitro* produced embryos. **Reprod. Dom Anim.** 28: 164-169. 1993.
- [15] GREVE, T.; XU, K.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P. *In vivo* development of *in vitro* fertilized bovine oocytes matured

- in vivo* versus *in vitro*. **J. In vitro Fertil. Embryo Transf.** 4: 281-285. 1987.
- [16] HAGEMANN, L.J.; BEAUMONT, S.E.; BERG, M.; DONNISON, M.J.; LEDGARD, A.; PETERSON, A.; SCHURMANN, A.; TERVIT, H.R. Development during single ivp of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. **Mol. Reprod. Dev.** 53: 451-458. 1999.
- [17] HENSLEIGH, H.; HUNTER, A. G. *In vitro* maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent *in vitro* fertilization and cleavage. **J. Dairy Sci.** 68:1456. 1985.
- [18] HUNTER, H.F.; GREVE, T. Could artificial insemination of cattle be more fruitful? Penalties associated with aging eggs. **Reprod. Dom. Anim.** 32: 137-142.1997.
- [19] HURTT, A.; LANDIM-ALVARENGA, F.; SEIDEL, G.; SQUIRES, E. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. **Theriogenol.** 54: 119-128. 2000.
- [20] HUSSEIN, T.; THOMPSON, J.; GILCHRIST, R. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Develop Biol.** 296: 514-521. 2006.
- [21] HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenol.** 47: 23-32. 1997.
- [22] IZADYAR, F.; HAGE, W.J.; COLENBRANDER, B.; BEVER, M.M. The promontory effect of growth hormone on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmatic maturation. **Mol Reprod and Develop.** 49:444-453. 1998.
- [23] KNIJN, H.; GJORRET, J.; VOS, P.; HENDRIKSEN, P.; VAN DER WEIJDEN, B.; MADDOX-HYTTEL, P.; DIELEMAN, S. Consequences of *in vivo* development and subsequent culture on apoptosis, cell number, and blastocyst formation in bovine embryos. **Biol. Reprod.** 69: 1371-1378. 2003.
- [24] KRISHER, R. The effect of oocyte quality on development. **J. Anim. Sci.** 82: E14-E23. 2004.
- [25] LONERGAN, P.; KHATIR, H.; CAROLAN, C.; MERMILLOD, P. Bovine blastocyst production *in vitro* after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. **J. Reprod. Fertil.** 109: 355-365. 1997.
- [26] LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M.P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. **Mol Reprod Dev.** 37: 48-53. 1994.
- [27] LUNA, H.S.; FERRARI, I.; RUMPF R. Influence of stage of maturation of bovine oocytes at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II at completion of maturation. **Anim Reprod Sci.** 68:23-28. 2001.
- [28] MARQUANT, B.; GERARD, M.; SOLARI, A.; THIBAUT, C. *In vitro* culture of bovine egg fertilized either *in vivo* or *in vitro*. **Reprod Fert Develop.** 29: 559-568. 1989.
- [29] MARTINO, A.; MOGAS, T.; PALOMO, M.J.; PARAMIO, M.T. Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. **Theriogenol.** 41: 969-980. 1994.
- [30] MASSIP, A.; MERMILLOD, P.; DINNYES, A. Morphology and biochemistry of *in vitro* produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. **Hum Reprod.** 10: 3004-3011. 1995.
- [31] PARK, Y.; KIM, S.; KIM, J.; PARK, H.; BYUN, M. The effects of duration of *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. **Theriogenol.** 64: 123-134. 2005.
- [32] PAVLOK, A.; KUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Mol. Reprod. Dev.** 31: 63-67. 1992.
- [33] PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Mol Reprod Dev.** 31: 63-67. 1992.
- [34] RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol. Reprod. Dev.** 61: 234-248. 2002.
- [35] SIRARD, M.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenol.** 65: 126-136. 2006.
- [36] SON, W.; LEE, S.; LIM, J. Fertilization, cleavage and blastocyst development according to the maturation timing of oocytes in *in vitro* maturation cycles. **Hum Reprod.** 20:3204-3207. 2005.
- [37] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS). SAS/STAT User's Guide, 8.2 Edition. Cary, NC, 2001.
- [38] SUTTON, M.; GILCHRIST, R.; THOMPSON, J. Effects of in-vivo and *in vitro* environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Hum. Reprod. Updat.** 9: 35-48. 2003.
- [39] TARU, S.G.; MAJUMDAR, A.C.; BONDE, S. Chronology of maturational events in goat oocytes cultured *in vitro*. **Small Rum Res.** 22: 25-30. 1996.

- [40] VAN SOOM, A.; BOERJAN, M.; YSEBAERT, M.; DE KRUIF, A. Cell allocation to the inner cell mass and the trophoctoderm in bovine embryos cultured in two different media. **Mol. Reprod. Dev.** 45: 171-182. 1996.
- [41] VILLAMEDIANA, P. embriones caprinos producidos *in vitro*: estudio citogenético y ultraestructural de ovocitos madurados y fecundados *in vitro*. Universidad Autónoma de Barcelona. España. Tesis de grado. 165p. 1998.
- [42] WARD, F.; ENRIGHT, B.; RIZOS, D.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. **Theriogenol.** 57: 2105-2117. 2002.
- [43] WEON-YOUNG, S.; SEOK-YOON, L.; JIN-HO, L. Fertilization, cleavage and blastocyst development according to the maturation timing of oocytes in *in vitro* maturation cycles. **Hum Reprod.** 20 (11): 3204-3207. 2005.
- [44] YADAV, B.R.; KATIYAR, P.K.; CHAUHAN, M.S.; MADAN, M.L. Chromosome configuration during *in vitro* maturation of goat, sheep and buffalo oocytes. **Theriogenol.** 47. 943-951. 1997.
- [45] ZUELKE, K.A.; BRACKETT, B.D. Luteinizing hormone-enhanced *in vitro* maturation of bovine oocyte with and without protein supplementation. **Biol. Reprod.** 43: 784-787. 1990.