

FECUNDACIÓN *in vitro* Y SUS EFECTOS SOBRE LA TASA DE DIVISIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO EN OVOCITOS DE CORDERA, CON Y SIN CÉLULAS DEL CÚMULUS: ESTUDIO COMPARATIVO DEL USO DE LA ALBÚMINA SÉRICA BOVINA Y EL SUERO DE OVEJA EN LOS MEDIOS DE CAPACITACIÓN

Effect of *in vitro* Fecundation of Prepubertal Sheep Oocytes With or Without Cumulus Cells on Cleavage and Embryo Development Rate: A Comparative Study of Bovine Serum Albumin and Sheep Serum Added to the Capacitation Media

Rafael Cano Torres *, **Lydia Gil Huerta ****, **Noelia González Ortí**, **Felisa Martínez Asensio**,
Clara Malo Ladrero y **Daniel Pinto Mualuzanga**

*Reproducción y Obstetricia, Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza, España. Miguel Servet, 177. 50013.
Tel: (34) 976761544. E- mail: *kno249@hotmail.com ** lydiagil@unizar.es*

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la albúmina sérica bovina (ASB) y el suero de oveja (SO), en los medios de capacitación seminal, en función de la tasa de división y desarrollo embrionario de ovocitos de corderas, madurados *in vitro* con (COCs) y sin células del cúmulus (ODs). El medio base de capacitación fue el fluido oviductal sintético con 2,38 mg/mL HEPES y 25 µg/mL Gentamicina, suplementado con 4 mg/mL ASB o 20% (v/v) SO. La fecundación se realizó con 1×10^6 espermatozoides/mL, seleccionados mediante un gradiente por movimiento a la superficie. Las tasas de división y desarrollo embrionario fueron evaluadas a 48 y 168 hrs. post inseminación, no encontrándose diferencias estadísticas en función de los medios de capacitación (ASB vs SO): 21,5 vs 24,3% para COCs y 10,8 vs 8,0% para ODs si se trata de división, y en caso de desarrollo 16,7 vs 16,6% para COCs y 2,1 vs 8,8% para ODs. Sin embargo, considerando la presencia o ausencia de células del cúmulus en el ovocito, hubo diferencias altamente significativas ($P < 0,001$) a favor de los COCs, quienes a su vez obtuvieron mejores resultados de maduración que los ODs: 69,5 vs 31,1%, respectivamente ($P < 0,001$). Estos resultados confirman que la ASB y el SO son buenos agentes de capacitación para los protocolos de producción *in vitro* de embriones. Por otro lado se confirmó que, con la eliminación de

las células del cúmulus previo a la maduración, ésta se reduce significativamente, lo mismo que las tasas de división y desarrollo embrionario. Sin embargo, puesto que parte de estos ovocitos consiguen desarrollarse a mórulas y blastocistos podrían ser utilizados en combinación con las nuevas técnicas reproductivas en clonación, producción de células madre, entre otras.

Palabras clave: Capacitación espermática, fecundación *in vitro*, corderas, embriones.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the effect of Bovine Serum Albumin (BSA) and Sheep Serum (SS) on seminal capacitation medium in accordance with division rate and embryo development of female lamb *in vitro* matured oocytes with (COCs) or without cumulus cells (ODs). The capacitation medium was synthetic oviductal fluid (SOF) supplemented with 2.38 mg/mL HEPES and 25 µg/mL Gentamicyne, with either 4 mg/mL BSA or 20% (v/v) SS. Sperms used for fecundation were isolated by swim up, with 1×10^6 sperms/mL concentration. Cleavage rate and embryo development were observed at 48 and 168 h post insemination, no finding any significant influence of the capacitation medium tested (BSA vs SS): 21.5 vs 24.3% for COCs and 10.8 vs 8% for ODs on cleavage rate, or on development 16.7 vs 16.6% for COCs and 2.1 vs 8.8% for ODs. Nevertheless, the oocyte type significantly influenced ($P < 0,001$) the

maturation rate, COCs oocytes got better maturation rates than ODs; 69.5 vs 31.1%, respectively. These results confirm that both BSA and SS are good capacitation agents for *in vitro* embryo production protocols. On the other side, it confirmed that removal of cumulus cells prior *in vitro* maturation reduces maturation, cleavage and embryo development rates. However, a part of these oocytes get develop to the morula stage, so it can't be reject to be used in combination with new reproductive techniques.

Key words: Sperm capacitation, *In vitro* fecundación, lambs, embryos.

INTRODUCCION

El uso de ovocitos de hembras prepúberes en conjunción con la transferencia de embriones y otros procedimientos como la maduración *in vitro* (MIV), fecundación *in vitro* (FIV), cultivo *in vitro* (CIV) e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) pueden aumentar la tasa de ganancia genética en los programas de reproducción, a través de la reducción del intervalo generacional [22, 30] Sin embargo, las evidencias disponibles de estudios en varias especies de mamíferos, incluyendo algunos roedores, bovinos (*Bos taurus-Bos indicus*), ovinos (*Ovis aries*) y porcinos (*Sus scrofa*) sugieren que los ovocitos de animales prepúberes tienen un potencial limitado para llevar a cabo una embriogénesis normal y producir descendencia viable [1].

Se ha demostrado que son pocos los embriones que desarrollan *in vitro* si son obtenidos de ovocitos de hembras prepúberes, en comparación con aquellos que son obtenidos de hembras adultas [19, 24, 25], tal vez como consecuencia de perturbaciones en la maduración [24], en las diferencias observadas en el metabolismo de la glutamina, en la ultraestructura [23] en deficiencias proteicas [19], sensibilidad en los mecanismos de liberación de Ca^{2+} [7, 9] a una reducida actividad sintética [18], etc.

Los componentes proteicos son esenciales en los medios de capacitación espermática de los protocolos de fecundación *in vitro* (FIV) de ovocitos de ovejas prepúberes, y aunque se han probado una gran cantidad de sustancias, con frecuencia la albúmina sérica bovina (ASB) y los sueros sanguíneos (SS), son los más utilizados como agentes de capacitación espermática [6, 8, 18].

Varios estudios han demostrado que el suero de oveja (SO) mantiene la viabilidad del semen ovino [31] además de inducir la capacitación seminal [4, 6] pero se desconoce el mecanismo por el cual facilita la penetración espermática en rumiantes. La ASB también se ha usado de forma habitual como suplemento de los medios de capacitación y fecundación [3, 6, 33, 34], sin embargo, no está clara la manera por la cual induce la capacitación y la reacción acrosómica, puesto que está contaminada por otros componentes, como: enzimas, hormonas, lípidos o iones orgánicos e inorgánicos [2].

La ASB y el SO han sido ampliamente utilizados como agentes de capacitación seminal, aunque la gran mayoría de los experimentos se han desarrollado en la especie bovina y porcina. El uso de la ASB y el SO en ovinos es frecuente, pero son escasos los estudios que comparan ambos suplementos bajo las mismas condiciones (método de separación de espermatozoides, tiempo de incubación, concentración, semen fresco o congelado, ovocitos de hembras adultas o prepúberes, temperatura, pH del medio, etc.) y los resultados obtenidos hasta el momento son muy dispares. Unido a esto, la variabilidad del producto entre casas comerciales y las diferencias entre lotes del mismo laboratorio [17], incrementan la dificultad de establecer un criterio homogéneo para el uso de la ASB o el SO en los medios de capacitación seminal de los protocolos de fecundación *in vitro* en ovinos.

Es por ello que el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la ASB y el SO, en los medios de capacitación de semen congelado, en función de la tasa de división y desarrollo embrionario de ovocitos de corderas prepúberes madurados *in vitro* con y sin células del cúmulus.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción *in vitro* de embriones (PIV)

Todos los reactivos, excepto los indicados tras ser mencionados, fueron obtenidos de la compañía química SIGMA (St. Louis MO, EUA).

Recolección y selección de ovocitos

Los ovocitos utilizados en este estudio fueron recuperados a partir de ovarios de corderas de 8 a 10 semanas de edad. Los ovarios se colectaron en el matadero local (MERCARAGOZA) y fueron transportados al laboratorio en frascos térmicos con Solución Salina Fosfatada de Dulbecco (PBS; D-4031) a 25-30 °C. El tiempo de transporte hasta el laboratorio fue inferior a 2 h. En el laboratorio, los ovarios fueron lavados con solución salina (0, 9% cloruro de sodio) y posteriormente se mantuvieron en PBS a 30 °C.

Todos los folículos visibles con un diámetro entre 2-6 mm fueron aspirados. La aspiración folicular fue hecha con una aguja 22G acoplada a una jeringa de 2mL. La clasificación y selección de los ovocitos se hizo en base a sus características morfológicas: a) ovocitos con citoplasma homogéneo y rodeados al menos de dos o más capas de células del cúmulus (COCs), b) ovocitos con citoplasmas homogéneos rodeados con dos capas o menos de células del cúmulus (ODs). A estos últimos ovocitos, se les eliminaron de forma mecánica todas las células cúmulus, para denudarlos por completo.

Maduración *in vitro* (MIV)

Previo a la maduración se hicieron dos lavados con TCM-199 (M-7628) suplementado con 1 µg/mL 17β-estradiol (C.Z. Veterinaria, S.A. Porriño, España), y un tercer lavado con

el mismo medio de maduración TCM-199, suplementado con 270 µg/mL de L-glutamina (G-1517), 10% (v/v) de suero de oveja (S-2263), 5 mg/mL de FSH/LH (HMG-Lepori, Farma-Lepori, S.A. Barcelona, España) y 41 µg/mL piruvato de sodio (P-4562). Los COCs y ODs fueron cultivados en paralelo en gotas de medio de maduración de 50 µL, cubiertas con aceite mineral (M-8410). Las condiciones de cultivo se mantuvieron a 38,5 °C en una atmósfera saturada de humedad y 5% de CO₂ en aire durante 24 h. Cada gota de medio contenía de 35 a 45 ovocitos.

Los ovocitos fueron evaluados tras 24 h. de iniciada la maduración para determinar la tasa de maduración *in vitro*. Para ello, se fijaron en ácido acético-etanol (1:3, v/v) durante 48 h. y se tiñeron con 1% de aceto-orceína. Los estadios de los ovocitos se categorizaron en Vesícula Germinal (VG), Vesícula Germinal Break-Down (VGBD), Metafase I (MI), Metafase II (MII) o Indefinido (Ind).

Capacitación espermática

Fueron evaluados dos suplementos de capacitación seminal. El medio base de capacitación fue Fluido Oviductal Sintético (SOF), 2,38 mg/mL de Hepes (H-9136) y 25 µg/mL Gentamicina (G1397) suplementado con 4 mg/mL ASB o 20% (v/v) SO.

Se utilizó una mezcla heterospérmica de semen ovino congelado, procedente de 3 machos de raza Assaf, con al menos un 30% de espermatozoides motiles progresivos tras la descongelación (Minitube, Ice Cube 14-S. Austria). El contenido de cada pajueta fue vertido en un tubo de ensayo con su respectivo medio de capacitación (1,8 mL) y fue centrifugado (Tehnica, Centric 150. Eslovenia) a 250 G durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y el pellet final fue resuspendido (1:1) nuevamente en su respectivo medio de capacitación (suplementado con ASB o SO). Posteriormente, fueron incubados (NUAIRE, DH Autoflow NU-5500. EUA) a 38,5 °C durante 45 min. Los espermatozoides fueron seleccionados mediante un gradiente de selección por movimiento a la superficie.

Fecundación *in vitro* (FIV)

Tras la MIV, todos los COCs fueron denudados mecánicamente, y posteriormente tanto los COCs como los ODs fueron divididos en dos grupos, los cuales fueron asignados a los medios de capacitación evaluados, para ser fecundados con ellos.

Previo a la fecundación, los grupos de COCs y ODs se lavaron dos veces en Fluido Oviductal Sintético (SOF) y a continuación se pasaron al medio de fecundación: SOF suplementado con 10% (v/v) SO, 32 µg/mL lactato de calcio (C-8356) y 20 µg/mL gentamicina (G1397). Ambos grupos de COCs y ODs fueron cultivados en paralelo en gotas de 50 µL de medio de fecundación cubiertas con aceite mineral. La concentración final para la fertilización fue de 1×10^6 espermatozoides/mL. Las condiciones de co-cultivo de espermatozoides-ovocitos

fueron de 38,5 °C en una atmósfera saturada de humedad y 5% CO₂ en aire durante 22 h.

Cultivo *in vitro* (CIV)

Finalizado el periodo de co-cultivo (22 h.), los presuntos cigotos fueron lavados 3 veces: 2 en SOF y una última en medio de cultivo embrionario SOF suplementado con 20 µL/mL de medio basal de Eagle (BME; B-6766), 10 µL/mL de medio mínimo esencial de Eagle (MEM; M-7145), 5% (v/v) Suero Fetal Bovino, 54,75 µg/mL de L-Glutamina, 8 mg/mL de ASB y 40 µg/mL Gentamicina (G1397). Los embriones fueron cultivados en gotas de 50 µL de medio cubiertas con aceite mineral. El CIV se llevó a cabo en sistema de incubación submarino (LEC. Instruments, SIS 200. Australia) a 38,5 °C. La mezcla de gases utilizada fue de 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂. El desarrollo inicial de los embriones fue evaluado 48 h. tras la inseminación de las placas, y el desarrollo embrionario a blastocistos fue evaluado a 168 h. post inseminación.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS 15,0 para sistema Windows (SPSS Inc. Chicago, EUA) y se aplicó la prueba de Ji-cuadrado (X²) de Pearson con el fin de contrastar y detectar diferencias significativas entre los diversos tratamientos. Utilizando los residuos tipificados corregidos, se determinó que resultados observados eran significativamente mayores o menores de lo esperado. El nivel de significancia se fijó en 0,05, de manera que se consideran significativos los resultados menores o iguales a dicho valor.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Maduración *in vitro*

Los resultados del muestreo de la tasa de maduración *in vitro* de COCs y ODs, se reflejan en la TABLA I. Tras 24 h. de maduración se encontraron diferencias altamente significativas (P<0,001) entre los COCs y ODs que alcanzaron el estadio de Metafase II (69,5 vs 31,1%, respectivamente). La proporción de COCs que reanudaron la meiosis fue del 100% mientras que para los ovocitos ODs fue de 91,3%. La mayor parte de los COCs que no completaron la meiosis se bloquearon en Metafase I (17,6%), mientras que los ODs se bloquearon en VGBD (39,8%). Los ovocitos que sufrieron alguna alteración durante el proceso de maduración y no se pudo determinar con exactitud su estado meiótico, fueron clasificados como en estadio indefinido y se encontraron en proporciones prácticamente semejantes (6,9% para COCs y 9,7% para ODs).

División y Desarrollo embrionario

Los resultados de la tasa de división y desarrollo embrionario (mórulas y blastocistos) de COCs y ODs fecundados con semen capacitado con ASB o SO, se muestran en la TABLA II.

TABLA I
TASAS DE MADURACIÓN *in vitro* DE COCs Y DOs.

Tipo de ovocito	No. de ovocitos	Estado Meiótico				
		Vesícula Germinal	Vesícula Germinal Breakdown	M I	M II	Indefinido
COC	131	0,0%	6,1% ^b	17,6%	69,5% ^a	6,9%
OD	103	8,7%	39,8% ^a	10,7%	31,1% ^b	9,7%

Significación estadística según la prueba de Ji-cuadrado, $P < 0,001$. ^a Resultados observados significativamente mayores que los esperados.

^b Resultados observados significativamente menores que los esperados.

TABLA II
TASAS DE DIVISIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO DE COCs Y DOs FECUNDADOS CON SEMEN CAPACITADO CON ASB O SO.

Tipo de ovocito	Tratamiento semen	No. ovocitos	Ovo. divididos	Ovo. Divididos		
				≤ 8 células	Mórulas	Blastos
COC	ASB	608	131 (21,5%) ^a	93 (71,0%)	16 (12,2%)	22 (16,7%)
	SO	596	145 (24,3%) ^a	92 (63,4%) ^b	29 (20,0%)	24 (16,6%)
OD	ASB	437	47 (10,8%) ^b	41 (87,2%) ^a	5 (10,6%)	1 (2,1%) ^b
	SO	423	34 (8,0%) ^b	23 (67,6%)	8 (23,5%)	3 (8,8%)
P*			< 0,001	0,026		

* Significación estadística según la prueba de Ji-cuadrado. ^a Resultados observados significativamente mayores que los esperados. ^b Resultados observados significativamente menores que los esperados.

Los datos obtenidos no permiten determinar diferencias estadísticas en las tasas de división y desarrollo embrionario debidas al agente de capacitación espermática. Sólo se pudo apreciar pequeñas diferencias porcentuales en la tasa de división, que en el caso de los COCs son favorables a los fecundados con semen capacitado con SO y en los ODs son a favor de la ASB. En los resultados de desarrollo embrionario a mórulas, estas diferencias porcentuales fueron a favor del SO, tanto en los COCs (12,2% ASB y 20,0% SO) como en los ODs (10,6% ASB y 23,5% SO), mientras que al desarrollo a blastocistos los resultados en los COCs fueron prácticamente iguales (16,7% ASB 16,6% SO), en los ODs estas diferencias fueron a favor de los fecundados con semen capacitado con SO (2,1% ASB y 8,8% SO).

Independientemente del agente de capacitación seminal empleado en la FIV, y analizando los resultados en función del tipo de ovocito es posible determinar diferencias altamente significativas ($P < 0,001$) en la tasa de división a favor de los ovocitos madurados con sus células del cúmulus. Si bien no fue posible determinar diferencias estadísticas en el desarrollo embrionario a mórulas y blastocistos, en el caso de los blastocistos son muy evidentes las diferencias porcentuales hacia los ovocitos madurados con sus células del cúmulus.

Son muchos los factores biológicos que actúan juntos preparando al ovocito inmaduro para desarrollar con éxito un embrión competente después de la fecundación. Sin embargo, uno de factores que comprometen los resultados de fecundación son los defectos en la maduración *in vitro*. Los defectos en la maduración del ovocito pueden ser causados por una maduración nuclear o citoplásmica inadecuada o incluso por un fallo de ambas [37]. La importancia de las células de cúmulus que rodean al ovocito ha sido bien establecida [10, 11, 16, 29, 38], ya que han sido implicadas, entre otras cosas, en la regulación del desarrollo del gameto femenino, la maduración meiótica, la interacción ovocito-espermatozoide [21], la adquisición de la capacidad de desarrollo, la capacidad para formar el pronúcleo masculino [32].

Existen reportes que indican que el SO mantiene la viabilidad del semen ovino [31], e induce la capacitación espermática [4, 6]. Autores como Huneau y col. [14] han conseguido tasas de división *in vitro* similares a las obtenidas *in vivo* utilizando 20% de SO en los medios de capacitación y fecundación. Así mismo, se ha demostrado que la ASB ejerce un efecto positivo en la capacitación de espermatozoides [35], ya que con la adición de 4 mg/mL de ASB en los medios de capacitación de semen ovino se han conseguido tasas de penetración

del 54,4% [34]. Sin embargo, el efecto de la ASB en las tasas de fertilización y el posterior desarrollo embrionario en ovinos es de los menos documentados [20]. Dada la escasez de estudios de ambos suplementos bajo las mismas condiciones de trabajo, es difícil realizar una comparación objetiva de su efecto en la tasa de división y desarrollo embrionario, cuando son usados como agentes de capacitación seminal. Es por ello que en este trabajo se ha procurado mantener las mismas condiciones para ambos medios de capacitación (método de separación de espermatozoides, tiempo de incubación, concentración, semen fresco o congelado, ovocitos de hembras adultas o prepúberes, temperatura, pH del medio, etc.), a tal grado de, por cada réplica de FIV, usar dos pajuelas del mismo semen procedentes del mismo lote y fecha de congelación.

Como refleja la TABLA I, sólo se obtuvieron altos porcentajes de MII (69,5%) en los ovocitos que maduraron en presencia de sus células del cúmulus, lo cual confirma la importancia de las células del cúmulus para conseguir un proceso normal de maduración nuclear. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros investigadores [12, 27, 39], quienes también observaron que tras el periodo de MIV un alto porcentaje de COCs alcanza la MII, mientras que los ODs registran una disminución considerable en los porcentajes de MII, consecuencia de la eliminación de las células del cúmulus antes de la MIV. En contraste, investigadores como Chian y col. [5] encontraron que, tras 24 horas de MIV, las proporciones de ovocitos en MII no eran diferentes cuando los ovocitos de bovino maduraron con o sin células del cúmulus, debido probablemente a la utilización de hembras adultas, sin embargo, estos investigadores también observaron que la proporción de ovocitos penetrados con pronúcleo masculino fue significativamente más alta en los ovocitos madurados con células del cúmulus (90%) que sin ellas (31%).

Otro dato que refleja la importancia de las células del cúmulus es el estadio en el cual se bloquean los ovocitos que no alcanzan la MII, ya que como se refleja en la TABLA I, a pesar de que la totalidad de los COCs reanudaron la meiosis (0,0% VG), la mayoría de los que no alcanzaron la MII, se bloquearon en el estadio de MI (17,6%). En el caso de los ODs, el 91,3% reanudaron la meiosis pero la mayoría de ellos (39,8%) se bloquearon en el estadio de VGBD. Con lo cual se confirma que la conexión inicial entre las células del cúmulus y el ovocito es esencial para completar la maduración nuclear.

Los resultados de la TABLA II reflejan que los resultados están más influenciados por la presencia o ausencia de células del cúmulus durante la MIV, que por el agente de capacitación seminal empleado en la FIV, reafirmando así la importancia de las células del cúmulus en la adquisición de la competencia ovocitaria en el posterior desarrollo embrionario. Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los obtenidos por varios investigadores [5, 13, 28, 39] los cuales observaron que, tras la MIV los ovocitos desnudos completan la meiosis son fecundados, inician la división temprana, posteriormente se bloquean y arrojan resultados de desarrollo em-

brionario inferiores a los ovocitos rodeados de células del cúmulus. No obstante, y para acrecentar la controversia, otros investigadores han observado que los ODs de ratón (*Mus musculus*) pueden exhibir la misma competencia al desarrollo que los ovocitos madurados *in vivo* [26, 36].

Finalmente, considerando que los ovocitos empleados en este trabajo proceden de corderas prepúberes, y arrojan resultados inferiores a los obtenidos con hembras adultas [15, 34], de acuerdo a los resultados de las tasas de división y desarrollo embrionario, se puede señalar que, tanto la ASB como el SO son buenos agentes de capacitación seminal (TABLA II).

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones presentes en este trabajo, la ASB y el SO demostraron ser buenos agentes de capacitación de espermatozoides ovinos. Sin embargo, ninguno de ellos arrojó un beneficio extra al protocolo de producción *in vitro* de embriones. Por otro lado, la eliminación de las células del cúmulus antes de la maduración *in vitro* trae como consecuencia una reducción significativa de los ovocitos que alcanzan la MII, así como de la tasa de división y desarrollo embrionario y, aunque en la ganadería industrial el uso de ODs no tenga mucha importancia, en animales de elevado valor genético o en especies en peligro de extinción, la utilización de este material biológico adquiere mayor importancia y se hace necesario su aprovechamiento, pues a pesar de los resultados tan limitados que se obtienen con los ODs, una parte de ellos son capaces de alcanzar la MII, son fecundados, dividen e inclusive llegan al estadio de mórulas y blastocistos, por lo que es posible que en un futuro se puedan aprovechar mucho mejor por medio de las nuevas tecnologías como la clonación, la producción de células madre, entre otros.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARMSTRONG, D. T. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. **Theriogenol.** 55: 1303-1322. 2001.
- [2] BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Hum Reprod Update.** 1(2): 91-148. 1995.
- [3] BONDIOLI, K. R.; WRIGHT, R. W. Jr. *In vitro* fertilization of ovulated and ovarian ovine oocytes. **Anim Sci.** 57: 1006-1012. 1983.
- [4] CHENG, W.T.W.; MOOR, R.M.; POLGE, C. *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. **Theriogenol.** 25: 146. 1986.
- [5] CHIAN, R.C.; NIWA, K.; SIRARD, M.A. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes *in vitro*. **Theriogenol.** 41(7): 1499-1508. 1994.

- [6] CROZET, N.; HUNEAU, D.; DESMEDT, V.; THERON, M. C.; SZOLLOSI, D.; TORRES, S.; SEVELLEC, C. *In vitro* fertilization with normal development in the sheep. **Gamete Res.** 16(2): 159-170. 1987.
- [7] DAMIANI, P.; FISSORE, P.; CIBELLI, J.; LONG, C.; BASILE, J.; ROBL, J.; DUBEY, R. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. **Mol Reprod Dev.** 45:521-534. 1996
- [8] DE SMEDT, V.; CROZET, N.; AHMED-ALI, M.; MARTINO, A.; COGNIE, Y. *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. **Theriogenol.** 37(5): 1049-1060. 1992.
- [9] DUBY, R.; DAMIANI, P.; LOONER, C. R.; FISSORE, R.; ROBL, J. Prepubertal calves as oocyte donors: Promises and problems. **Theriogenol.** 45:121-130. 1996.
- [10] FURNUS, C.C.; DE MATOS, D.G.; MOSES, D.F. Cumulus expansion during *in vitro* maturation of bovine oocytes: relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent embryo development. **Mol Reprod Dev.** 51(1): 76-83. 1998.
- [11] GESHI, M.; TAKENOUCHE, N.; YAMAUCHI, N.; NAGAI, T. Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. **Biol Reprod.** 63(6): 1730-1734. 2000.
- [12] GROCHOLOVÁ, R.; PRET, J.; MAREK, J.; TEPLÁ, O. Beneficial influence of vero cells on *in vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. **Theriogenol.** 44: 199-207. 1995.
- [13] HASHIMOTO, S.; SAEKI, K.; NAGAO, Y.; MINAMI, N.; YAMADA, M.; UTSUMI, K. Effects of cumulus cell density during *in vitro* maturation of the developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenol.** 49(8): 1451- 1463. 1998.
- [14] HUNEAU, D.; CROZET, N.; AHMED-ALI, M. Estrous sheep serum as a potent agent for ovine IVF: Effect on cholesterol efflux from spermatozoa and the acrosome reaction. **Theriogenol.** 42: 1017-1028. 1994.
- [15] KOCHHAR, H. P.; WU, B.; MORRIS, L. H.; BUCKRELL, B. C.; POLLARD, J. W.; BASRUR, P. K.; KING, W. A. Maturation status, protein synthesis and developmental competence of oocytes derived from lambs and ewes. **Reprod Dom Anim.** 37(1): 19-25. 2002.
- [16] LEDDA, S.; BOGLIOLO, L.; LEONI, G.; NAITANA, S. Cell coupling and maturation-promoting factor activity in *in vitro*-matured prepubertal and adult sheep oocytes. **Biol Reprod.** 65(1): 247-252. 2001.
- [17] LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; CRITSER, E.S.; FIRST, N.L. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. **Biol Reprod.** 35(4): 850-857. 1986.
- [18] LEONI, G. G.; SUCCU, S.; BERLINGUER, F.; ROSATI, I.; BEBBERE, D.; BOGLIOLO, L.; LEDDA, S.; NAITANA, S. Delay on the *in vitro* kinetic development of prepubertal ovine embryos. **Anim Reprod Sci.** 92(3-4): 373-383. 2006.
- [19] LEVESQUE, J. T.; SIRARD, M. A. Protein in oocytes from calves and adult cows before maturation: relationship with their development capacity. **Reprod Nutr Dev.** 34:133-139. 1994.
- [20] LI, F.; PI, W. H.; ZHU, H. Z.; ZHANG, S. S.; LIU, S. R.; XUE, J. L. The effect of estrous ewe serum and heparin on *in vitro* fertilization and subsequent embryonic development in sheep. **Small Rum Res.** 63: 226-232. 2006.
- [21] LUCIANO, A. M.; LODDE, V.; BERETTA, M. S.; COLLEONI, S.; LAURIA, A.; MODINA, S. Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co-culture system with intact cumulus-oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glutathione. **Mol Reprod Dev.** 71(3): 389-397. 2005.
- [22] NICHOLAS, F. W. Genetic improvement through reproductive technology. **Anim Reprod Sci.** 42:205-214. 1996.
- [23] O'BRIEN, J. K.; DWARTE, D.; RYAN, J. P.; MAXWELL, W. M.; EVANS, G. Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. **Reprod Fertil Dev.** 8:1029-1037. 1996.
- [24] O'BRIEN, J., K.; CATT, S. L.; IRELAND, K. A.; MAXWELL, W. M.; EVANS, G. In vitro and *in vivo* developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. **Theriogenol.** 47(7): 1433-1443. 1997.
- [25] PINKERT, C. A.; KOOYMAN, D. L.; BAUMGARTNER, A.; KEISLER, D. H. *In vitro* development of zygotes from superovulated prepubertal and mature gilts. **Reprod Fertil.** 87:63-66. 1989.
- [26] SCHROEDER, A.C.; EPPIG, J.J. The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously *in vitro* is normal. **Dev Biol.** 102(2): 493-497. 1984.
- [27] SHIRAZI, A.; SHAMS-ESFANDABADI, N.; HOSSEINI, S. M.; KARIMI, I. The presence of cumulus cells on nuclear maturation of sheep oocytes during *in vitro* maturation. **Small Rum Res.** 68(3): 291-295. 2007.
- [28] STAIGMILLER, R.; MOOR, R. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. **Gamete Res.** 9: 221-229. 1984.
- [29] TAJIK, P.; NIWA, K.; MURASE, T. Effects of different protein supplements in fertilization medium on *in vitro* penetration of cumulus-intact and cumulus-free bovine oocytes matured in culture. **Theriogenol.** 40(5): 949-958. 1993.

- [30] TERVIT, H. R. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. **Anim Reprod Sci.** 42:227-238. 1996.
- [31] THOMPSON, J.G.E.; CUMMINS, J.M. The effects of washing and protein supplementation on the acrosome reaction of ram spermatozoa *in vitro*. **Anim Reprod Sci** 9: 75-86. 1985.
- [32] VANDERHYDEN, B.C.; ARMSTRONG, D.T. Role of cumulus cells and serum on the *in vitro* maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. **Biol Reprod.** 40(4): 720-728. 1989.
- [33] WANG, S.; LIU, Y.; HOLYOAK, G. R.; EVANS, R. C.; BUNCH, T. D. A protocol for *in vitro* maturation and fertilization of sheep oocytes. **Small Rum Res.** 29:83-88. 1998.
- [34] WANI, N. A.; WANI, G. M.; KHAN, M. Z.; SALAHUDIN, S. Effect of oocyte harvesting techniques on *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization in sheep **Small Rum Res** 36(1): 63-67. 2000.
- [35] WANI, N.A. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of sheep oocytes: Review. **Small Rum Res.** 44: 89-95. 2002.
- [36] YAMAZAKI, Y.; WAKAYAMA, T.; YANAGIMACHI, R. Contribution of cumulus cells and serum to the maturation of oocyte cytoplasm as revealed by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **Zygote.** 9(4): 277-282. 2001.
- [37] YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, P. E.; PRESICCE, G. A. Control of oocyte maturation in cows-biological factors. **Theriogenol.** 49(2): 471-482. 1998.
- [38] YOUNIS, A.I.; BRACKETT, B.G. Importance of cumulus cells and insemination intervals for development of bovine oocytes into morulae and blastocysts *in vitro*. **Theriogenol.** 36(1): 11-21. 1991.
- [39] ZHANG, L.; JIANG, S.; WOZNIAK, J. P.; YANG, X.; GODKE, R. A. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development *in vitro*. **Mol Reprod Dev.** 40(3): 338-344. 1995.