



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**“ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LA ZONA
PELÚCIDA DE OVOCITOS CANINOS INMADUROS Y
MADURADOS *IN VITRO*”**

Jennifer Hetz Rodríguez

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario
Departamento De Fomento De
La Producción Animal

PROFESORA GUÍA: DRA. MÓNICA DE LOS REYES S.

FINANCIAMIENTO: PROYECTOS ENL 05/8 DID; FONDECYT 1060602

SANTIAGO, CHILE
2008



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LA ZONA PELÚCIDA DE
OVOCITOS CANINOS INMADUROS Y MADURADOS *IN VITRO***

Jennifer Hetz Rodríguez

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento De Fomento De
La Producción Animal

NOTA FINAL:

NOTA FIRMA

PROFESOR GUIA : MONICA DE LOS REYES S.

PROFESOR CONSEJERO : MARIA SOLEDAD FERNANDEZ.

PROFESOR CONSEJERO : WALTER VON FREY.

**SANTIAGO, CHILE
2008**

Esta Tesis de Grado se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal, Departamento de Fomento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Contó con el financiamiento de los Proyectos ENL 05/8 DID y FONDECYT 1060602.

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Mónica De Los Reyes S., mi profesora guía, le agradezco la disposición, experiencia, apoyo y orientación.
- Al Sr. Jaime Palominos por toda su ayuda, paciencia y disposición.
- Al Sr. Pedro Córtez por su colaboración y apoyo.
- A la Ilustre Municipalidad de La Pintana y a los Médicos Veterinarios que trabajan en el pabellón de esterilización por su ayuda desinteresada.
- Al Dr. Claudio Barros y Dr. Ricardo Moreno del Laboratorio de Embriología de la Pontificia Universidad Católica de Chile, gracias por permitir que trabajar en sus dependencias.
- A la Srta. Macarena Moreno del laboratorio de microscopía electrónica, Facultad de Física, Pontificia Universidad Católica de Chile, por su disposición y ayuda.
- A la Dra. Valeria Rojas por ayudarme con el análisis estadístico de esta Memoria.
- A mi marido Victor Bunster, por su paciencia y ayuda en el análisis de mis muestras.

ÍNDICE

página:

Resumen	5
Abstract	7
Introducción	9
Revisión Bibliográfica	11
I. Ovogénesis	11
II. Zona pelúcida	13
III. Maduración <i>in vitro</i> en caninos	15
Hipótesis	18
Objetivo General	18
Objetivos Específicos	18
Materiales y Método	19
I. Obtención de Ovocitos	19
II. Maduración <i>in vitro</i>	20
III. Fijación de ovocitos	20
IV. Procesamiento y evaluación en microscopía electrónica de barrido (MEB)	20
V. Análisis estadístico	21
Resultados	22
Discusión	28
Conclusiones	35
Bibliografía	36
Anexos	43

RESUMEN

Durante la maduración ovocitaria el ovocito experimenta cambios a nivel nuclear, citoplasmático y de sus cubiertas, encontrándose en esta última la zona pelúcida (ZP), cubierta extracelular que cumple importantes funciones en el reconocimiento gamético durante la fecundación.

El objetivo de este trabajo fue evaluar mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) los cambios a nivel ultraestructural en la ZP durante la maduración ovocitaria *in vitro*, comparando la ZP de ovocitos inmaduros y aquellos madurados en cultivo. También se evaluó el estado morfológico de la ZP de ovocitos de perra durante el proceso de maduración *in vitro*, a través de dos tiempos de cultivo (72 y 96 horas). Paralelamente, se evaluó el diámetro de los ovocitos con su ZP, en estado inmaduro y sometidos a maduración en cultivo.

De ovarios de perras sanas sometidas a ovariectomía se obtuvo un total de 500 ovocitos a través de cortes finos, en un total de 15 réplicas experimentales. Se seleccionaron los ovocitos, de mayor tamaño (diámetro), con su citoplasma homogéneo y completamente rodeados por al menos tres capas de células del cúmulo. Los ovocitos seleccionados en cada réplica fueron divididos en dos grupos: un grupo se incubó para maduración *in vitro* en medio TCM 199 suplementado y el otro grupo se procesó inmediatamente en estado de ovocitos inmaduros.

La fijación de los ovocitos inmaduros y madurados *in vitro* se realizó posterior a la extracción de las células del cúmulo. Para ello, fueron lavados en buffer Cacodilato 50 mM por 15 minutos y luego fijados en glutaraldehído 2,5% por un mínimo de 24 h. Posteriormente se realizó una postfijación con Tetroxido de Osmio al 2%, luego los ovocitos fueron colocados en cámaras de cobre cerradas para ser deshidratados mediante concentraciones crecientes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% y 100%). La deshidratación de los ovocitos se completó mediante secado de punto crítico del CO₂. Luego fueron

montados en porta-especímen para ser sombreados con oro-paladio. Las muestras se analizaron bajo el MEB marca “LEO” modelo 1420 VP.

La medición del trabeculado de la zona pelúcida y del tamaño ovocitario se llevó a cabo mediante el programa “AutoCad 2006” a un total de 93 ovocitos a partir de las fotografías tomadas en el MEB. Del total de ovocitos analizados 30 pertenecían a estado inmaduro, 31 a 72 horas de maduración y 32 a 96 horas de maduración. Los resultados se evaluaron por el análisis de varianza de un factor o clasificación simple y la prueba de Tukey para determinar la significancia de las diferencias $P \leq 0,05$.

Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre ovocitos inmaduros y madurados *in vitro*, tanto a 72 como a 96 h. En ovocitos antes de la maduración en cultivo se observó que los agujeros de la ZP eran compactos y de poco tamaño, en cambio en los ovocitos ya madurados *in vitro*, los agujeros de la ZP presentaron un tamaño mayor. Comparando los dos tiempos de maduración *in vitro* empleados en este trabajo, se observó mayor tamaño de agujeros en el trabeculado de la ZP de ovocitos madurados por 72 h en comparación a aquellos madurados por 96 h. En el tamaño ovocitario no se encontró un aumento significativo entre los ovocitos madurados *in vitro* respecto a los inmaduros.

Tanto en los ovocitos inmaduros como en los madurados en sistema de cultivo se observó en un alto porcentaje, aproximadamente un 81% de un total de 500 ovocitos, cierto grado de daño morfológico en la ZP, encontrando una mayor proporción de daño en los ovocitos que se sometieron a un sistema de maduración *in vitro*.

De los resultados se puede concluir que durante la maduración ovocitaria *in vitro* hay cambios estructurales a nivel de la ZP en ovocitos caninos, los que podrían influir en la capacidad de unión y penetración del espermatozoide a través de la ZP durante la interacción de los gametos.

ABSTRACT

During maturation, the oocyte undergoes nuclear and cytoplasmic changes, including oocytes investment. The later involves zona pellucida (ZP), which is an extracellular matrix that plays important functions in gamete interaction during fertilization.

The objective of this work was to compare at the ultrastructural level by means of scanning electron microscopy (SEM), possible ZP changes between immature and *in vitro* matured bitch oocytes cultured during two different periods (48 and 72 h.). Furthermore, morphological appearance of the oocytes and their sizes were also compared.

A total of 500 cumulus complex oocytes (COC's) were obtained from canine ovaries following ovariectomy throughout 15 experimental replicates. Oocytes were selected under stereoscopic microscope choosing for experiments only the biggest ones, with homogeneous dark cytoplasm and with more than three compact cumulus cells layers. The COC's were allocated into three groups: one group was incubated for *in vitro* maturation in TCM 199 supplemented medium for 72 h, the second group was cultured in the same medium for 96 h, and the third group was processed at immature state.

Immature and *in vitro* matured oocytes were fixed for 24 h in 2.5% glutaraldehyde post rinsed for 15 minutes in 50mM Cacodylate buffer. The oocytes were post fixed in 2% osmium tetroxide and dehydrated in increasing concentration of acetones, critical point dried, mounted and sputted with palladium-gold target. The samples were evaluated with a "LEO" 1420 VP SEM.

The ZP trabeculates and oocytes size were measured by "AutoCad 2006" software on a total of 93 oocytes. From the total, 30 oocytes were evaluated at immature state, 31 after 72 hs and 32 after 96 h of culture. The results were evaluated by one way anova using Tukey's test to determinate the differences $P < 0.05$.

Significant differences were found ($P < 0.05$) between the ZP surface of immature and *in vitro* matured oocytes. Before IVM, the ZP surface showed tight holes ($0.69 \mu\text{m}$) and after culturing, the ZP surface was characterized by large holes. In both culture times (72 and 96 h) the trabeculates showed differences ($P < 0.05$) between each time period (1.56 - $1.42 \mu\text{m}$; 72 and 96 h). The biggest holes were observed in oocytes cultured for 72 h.

There was not found any significant differences between oocytes sizes ($P > 0.05$) with either immature or *in vitro* matured oocytes at 72 or 96 h.

A high rate of morphologic damage, approximately 81% of 500, in immature and *in vitro* matured oocytes, were observed. However, greater proportion of damage was observed *in vitro* matured oocytes than in immature oocytes ($P < 0.05$).

In conclusion, the results show that there were structural changes in ZP during *in vitro* maturation of canine oocytes, and this changes could have an influence in binding and sperm penetration through the ZP during the gamete interaction.

INTRODUCCIÓN

En la especie canina, el estudio y manejo de los gametos *in vitro* aun tiene un porcentaje limitado de éxito. La maduración *in vitro* (MIV) presenta una eficiencia baja comparada con otras especies animales, lo que conlleva a limitar el desarrollo de otras biotecnologías reproductivas como la fecundación, desarrollo y manipulación embrionaria *in vitro* (Luvoni *et al.*, 2003; De los Reyes *et al.*, 2005).

Diferentes son los factores que influyen en la eficiencia de la maduración en el cultivo de ovocitos, lo que no siempre coincide con lo descrito entre las distintas especies animales. La eficiencia baja (promedio 20%) en la maduración de ovocitos caninos *in vitro* se relaciona además, a características que poseen estos ovocitos que difieren a las de las otras especies mamíferas (Saint-Dizier *et al.*, 2001; Luvoni *et al.*, 2003; De los Reyes *et al.*, 2005).

Durante la maduración el ovocito experimenta cambios a nivel nuclear, citoplasmático y de sus cubiertas, encontrándose en esta última, las células del cúmulo externamente e internamente la zona pelúcida (ZP), cubierta extracelular que cumple importantes funciones en el reconocimiento gamético durante la fecundación (Barros *et al.*, 1996; Blackmore *et al.*, 2004; Sánchez y De los Reyes, 2004). La evaluación de la MIV en caninos se ha basado principalmente en los cambios que experimentaría el núcleo y las células del cúmulo (Saint-Dizier *et al.*, 2001; De los Reyes *et al.*, 2005), y eventualmente los cambios citoplasmáticos que han sido evaluados en pocos estudios, a través de los gránulos corticales (De los Reyes *et al.*, 2007^b) o de la fecundación misma, con la unión de los pronucleos (Saint-Dizier *et al.*, 2001).

En sistemas *in vitro* de ovocitos de otras especies como: ratones (Calafell *et al.*, 1992), caprinos (Villamediana *et al.*, 1999) y bovinos (Suzuki *et al.*, 1994), se ha observado que la superficie de la ZP experimentaría transformaciones durante esta etapa de maduración.

Estos cambios podrían influir en la capacidad de unión y penetración del espermatozoide a la ZP durante la interacción de los gametos (Suzuki *et al.*, 1994; Villamediana *et al.*, 1999).

Estudios de fecundación *in vitro* en perros, realizados con ZP de ovocitos inmaduros y ZP mantenidas congeladas o en soluciones salinas, han demostrado diferencias a nivel de la ultraestructura de la ZP (Ström-Holt *et al.*, 2000). Antecedentes aun no publicados en caninos, indicarían distintos porcentajes de penetración espermática entre ovocitos inmaduros y madurados en cultivo (De Los Reyes *et al.*, 2007^a), esto podría indicar posibles cambios en las características de la ZP durante la maduración de los ovocitos lo que aun no ha sido demostrado en esta especie.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Ovogénesis

La ovogénesis es el proceso de formación y maduración de los gametos femeninos, los ovocitos. Este proceso se inicia en las hembras durante su desarrollo embrionario a partir de las células germinales primordiales, las que a través de procesos celulares se transforman en ovogonias que posteriormente se transformarán en ovocitos primarios dentro de los folículos primordiales (Yang *et al.*, 1998; Eppig, 2001; Miyano, 2005).

Las hembras mamíferas nacen con un número determinado de folículos primordiales, con ovocitos detenidos en la profase de la primera división meiótica, en etapa de “dictioteno” (ovocito primario) (Downs, 1993; Quian *et al.*, 2003; Miyano, 2005). Esta detención en la meiosis es conocida como “arresto meiótico”, donde los ovocitos permanecen hasta poco antes de cada ovulación. Este estado de desarrollo se caracterizan por poseer un núcleo grande denominado vesícula germinativa (VG) que contiene cromatina descondensada (Downs, 1993; Eppig, 2001; Sun y Nagai, 2003).

La maduración ovocitaria se ha definido como el período que comprende entre el reinicio de la meiosis, hasta su posterior detención, en la etapa de metafase de la segunda división meiótica (MII) (Fulka *et al.*, 1998; Eppig, 2001; Mehlmann, 2005). El reinicio de la meiosis es un proceso que ocurre como respuesta al alza preovulatoria de gonadotrofinas, básicamente la hormona leutinizante (LH) (Downs, 1993; Eppig, 2001; Qian *et al.*, 2003; Mehlmann, 2005); permitiendo así la maduración del ovocito, tanto a nivel nuclear como citoplasmático. A nivel nuclear el ovocito progresa hasta MII, eliminando el primer corpúsculo polar (Downs, 1993; Saint-Dizier *et al.*, 2001; Sun y Nagai, 2003). En el citoplasma, los gránulos corticales originados en el aparato de Golgi, también presentan cambios, básicamente en su distribución (Qian *et al.*, 2003; Sun y Nagai, 2003). En el ovocito primario, los gránulos se distribuyen en la región periférica del citoplasma, después del alza de LH migran al citoplasma cortical, cerca de la membrana celular (Qian *et al.*, 2003; De los Reyes *et al.*, 2007^b). Esta distribución cortical tiene una función importante

posteriormente, durante la fecundación, los gránulos corticales se fusionan con la membrana plasmática y liberan su contenido en el espacio perivitelino (Hoodbhoy y Talbot, 1994). Los distintos componentes liberados impiden la unión de más de un espermatozoide a la zona pelúcida (Hoodbhoy y Talbot, 1994) debido a modificaciones en polisacáridos terminales de glicoproteínas de la ZP (Aviles *et al.*, 1996). Los gránulos corticales, por tanto, son los responsables de bloquear la poliespermia protegiendo al embrión de la fecundación heteróloga (Hoodbhoy y Talbot, 1994; Aviles *et al.*, 1996; Wassarman, 1996).

Dentro de los cambios que se producen en la etapa de maduración de los ovocitos, está también, el aumento de las uniones de comunicación “gap junction” entre las células del cúmulo ooforo y el ovocito (Downs, 1993). Esta comunicación es importante para regular los factores responsables de la maduración citoplasmática (Hiroyuki *et al.*, 2000; Sun y Nagai, 2003) y aportar a los ovocitos los aminoácidos necesarios para el crecimiento como también la mayor parte de los ribonucleótidos y ribonucleósidos necesarios en la maduración (Wassarman, 1996; Hiroyuki *et al.*, 2000). Otro cambio que se produce es la mucificación o expansión de las células del cúmulo (Hiroyuki *et al.*, 2000; Eppig, 2001; Sutton-McDowall *et al.*, 2004), estas células están insertas en una matriz de ácido hialurónico y proteínas que durante la maduración se hidratan aumentando los espacios entre las células, causando de esta manera la expansión (Yanayamachi, 1994; Hiroyuki *et al.*, 2000; Eppig, 2001; Sutton-McDowall *et al.*, 2004). En la perra a medida que las células del cúmulo se expanden y pierden contacto con el ovocito, este inicia la maduración; sin embargo la capa más interna de células del cúmulo permanece adherida al ovocito hasta que completa la maduración (Farstad, 2000; Luvoni, 2000; Reynaud *et al.* 2006; Otoi *et al.*, 2007). Otra característica adquirida durante la maduración es la capacidad de descondensar el núcleo espermático e inducir la formación del pronúcleo masculino (Eppig, 2001; Sun y Nagai, 2003).

El tamaño ovocitario también podría experimentar algún cambio durante y después de la maduración. En bovino se ha comprobado una disminución del tamaño al medir ovocitos sin su ZP tanto en sistemas de maduración *in vivo* como *in vitro*, posiblemente debido a cambios estructurales a nivel del citoesqueleto (Suzuki *et al.*, 1998). La eliminación del

primer corpúsculo polar como posible causa de disminución del tamaño ovocitario se descartaría al no encontrar diferencias entre ovocitos bovinos que experimentaron la eliminación y los que no (Suzuki *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1998). Por otro lado si se miden ovocitos con su ZP es posible que cambie la relación entre maduración/tamaño. Viaris de Lesegno *et al.*, (2007), obtuvo diferencias en tamaño entre ovocitos caninos obtenidos desde folículos preovulatorios, ovocitos inmaduros y madurados, presentando los ovocitos inmaduros un menor tamaño, lo que indicaría una disminución del tamaño en el ovocito ovulado el que aumenta durante la maduración ovocitaria a nivel oviductual.

En la mayoría de los mamíferos la ovulación ocurre cuando a nivel nuclear, los ovocitos han alcanzado la metafase de la segunda división meiótica (MII), condición que sería necesaria para ser fecundados adecuadamente (Down, 1993; Sun y Nagai, 2003; Fulka *et al.*, 1998). En los caninos, en cambio, la ovulación se produce en la profase de la primera división meiótica, en estado inmaduro, como ovocitos primarios (Saint-Dizier *et al.*, 2001; Luvoni *et al.*, 2003; De los Reyes *et al.*, 2005^a), por lo que la maduración se produce en el oviducto, iniciándose 48-54 h después de la ovulación (Reynaud *et al.*, 2005; Reynaud *et al.*, 2006), demorando aproximadamente 2-3 días en completarse (Saint-Dizier *et al.*, 2001; Luvoni *et al.*, 2003; Reynaud *et al.*, 2005).

Zona Pelúcida

La ZP es una cubierta extracelular que envuelve el ovocito, siendo producida por las células de la granulosa y por el ovocito en crecimiento en su etapa de mayor actividad metabólica durante la ovogenesis (Yanayamachi, 1994; Wassarman *et al.*, 1996; Blackmore *et al.*, 2004). En una fase temprana de su crecimiento la ZP aparece como parches de fino filamento entre el ovocito y las células foliculares. A medida que el crecimiento ovocitario continúa, la ZP se vuelve una densa y gruesa red de filamentos interconectados rodeando completamente al ovocito y separándolo de las células foliculares (Yanayamachi, 1994; Wassarman *et al.*, 1996; Sánchez y De los Reyes, 2004).

La ZP está compuesta por glicoproteínas sulfatadas, denominadas en la mayoría de las especies estudiadas como: ZP1, ZP2, ZP3, las que se forman durante la ovogénesis. Estas proteínas son depositadas entre el ovocito y las células granulosas en etapas tempranas del crecimiento folicular (Barros *et al.*, 1996; Wassarman *et al.*, 1996, Blackmore *et al.*, 2004). Estas glicoproteínas se organizan en una estructura tridimensional donde ZP2 y ZP3 forman filamentos los cuales son cruzados por ZP1 (Barros *et al.*, 1996; Wassarman *et al.*, 1996). Las distintas especies mamíferas presentan diferencias en la síntesis y en la estructura de sus glicoproteínas. En los caninos estas glicoproteínas también se clasifican como ZP1, ZP2 y ZP3 (Sánchez y De los Reyes, 2004), las cuales son producto de tres familias de genes, ZPA, ZPB y ZPC (Blackmore *et al.*, 2004). Al igual que en otros mamíferos, la unión y penetración espermática a la ZP es el primer paso de la fecundación, los espermatozoides deben reconocer y unirse a las glicoproteínas de la ZP para poder llevar a cabo la penetración (Barros *et al.*, 1996; Ström Holst *et al.*, 2000).

Para que ocurra la unión, penetración y fecundación, la ZP presenta funciones, como la de servir de ligando primario (ZP3) para receptores de la membrana plasmática del espermatozoide (Yanayamachi, 1994; Barros *et al.*, 1996); inducir la reacción acrosómica (ZP3) (Barros *et al.*, 1996, Wassarman *et al.*, 1996) ser ligando secundario para receptores expuestos luego de la reacción acrosómica (ZP2) (Barros *et al.*, 1996; Sánchez y de Los Reyes, 2004) evitar tanto la poliespermia (Barros *et al.*, 1996; Eppig, 2001) como la fecundación heteróloga y proteger al ovocito del entorno (Barros *et al.*, 1996; Blackmore *et al.*, 2004).

La unión primaria entre la ZP y el espermatozoide ocurre por la presencia de la glicoproteína ZP3 (Barros *et al.*, 1996, Yanayamachi, 1994). Esta interacción induce la reacción acrosómica, lo que permite la exposición de enzimas acrosomales, como el sistema proacrosina/acrosina (Barros *et al.*, 1996; De los Reyes y Barros, 2000; Brewis *et al.*, 2001). Esta enzima al ser liberada en la superficie del ovocito actuaría como unión secundaria junto con la glicoproteína ZP2 hecho importante en la interacción y penetración del espermatozoide a través de la ZP (Jones, 1991; Barros *et al.*, 1996; De los Reyes y Barros, 2000; Cortés *et al.*, 2006).

La penetración de la ZP por parte del espermatozoide es un paso crucial durante la fecundación. Los espermatozoides que no tienen la capacidad de reconocer ni unirse a las glicoproteínas de la ZP o responder ante la presencia de ésta mediante la RA, son incapaces de llevar a cabo una fecundación exitosa (Yanagimachi, 1994; Töpfer-Petersen *et al.*, 2000). Los carbohidratos residuales de las glicoproteínas de la ZP, en este caso ZP3, tiene un rol importante en este reconocimiento y actúa como un receptor especie-específico que permite prevenir la fecundación heteróloga o intraespecífica (Aviles *et al.*, 1996; Wassarman *et al.*, 1996; Blackmore *et al.*, 2004).

Otra de las funciones de la ZP es proteger al ovocito de una posible fecundación con más de un espermatozoide (Barros *et al.*, 1996; Eppig, 2001). Para evitar este fenómeno de poliespermia, la mayoría de los animales tanto mamíferos como no mamíferos experimentan cambios en la membrana plasmática y ZP (Gardner, y Evans, 2006), la membrana plasmática del ovocito al ponerse en contacto con el espermatozoide, se activa y se depolariza, lo que se conoce como bloqueo rápido o primario de la poliespermia, se produce en especies pertenecientes a los Phylum Mollusca y Equinodermos en sólo unos segundos (Gardner y Evans, 2006), previniendo la fusión de otros espermatozoides a la membrana del ovocito (Yanagimachi, 1994; Gardner y Evans, 2006). El bloqueo lento o secundario, está dado por la exocitosis de los gránulos corticales del ovocito hacia el espacio perivitelino, en donde las enzimas liberadas al tomar contacto con la ZP modifican las glicoproteínas las que pierden su función y capacidad de unión al espermatozoide. Ambos tipos de bloqueo en los animales mamíferos suceden al mismo tiempo (Barros y Yanagimachi, 1971; Yanagimachi, 1994; Aviles *et al.*, 1996; Gardner y Evans, 2006).

Maduración *in vitro* en caninos

La MIV es un proceso en el cual los ovocitos se someten en un medio artificial de cultivo celular para lograr, del punto de vista nuclear, reiniciar la meiosis y alcanzar el estado de MII. (Luvoni *et al.*, 2003; Sun y Nagai, 2003; De los Reyes *et al.*, 2005).

Se sabe que un exitoso sistema de MIV se basa en las condiciones ambientales *in vivo* (Luvoni *et al.*, 2003; De los Reyes *et al.*, 2005). En caninos, el sistema es más complejo ya que el proceso involucra imitar además del ambiente folicular preovulatorio, el oviductual. Este hecho, sumado a que aun existe poca investigación en esos animales comparado con lo estudiado en otras especies como humanos, especies de laboratorio o de producción, ha implicado que la eficiencia de la MIV, sea aun baja (Saint-Dizier *et al.*, 2001; De los Reyes *et al.*, 2005).

Un factor que podría estar influyendo en el bajo éxito de maduración *in vitro* es el cultivo de ovocitos meioticamente incompetentes (Farstad, 2000). La apariencia morfológica de los ovocitos y células del cúmulo y el diámetro del ovocito y del folículo han sido identificados como parámetros indicadores de competencia meiótica (Fastard, 2000; Luvoni, 2000; Otoi *et al.*, 2000; Otoi *et al.*, 2001; Songsasen y Wildt, 2005). Otros factores que podrían influir en la capacidad del ovocito de reiniciar y completar la meiosis es la edad y el ciclo estral de la perra; sin embargo esto último crea controversia ya que no tendría una influencia directa sobre la maduración sino mas bien un efecto en el tamaño del folículo y del ovocito (Otoi *et al.*, 2001; Willingham-Rocky *et al.*, 2003; Songsasen y Wildt, 2005, Rodríguez y Rodríguez, 2006; Songsasen y Wildt, 2007).

El estudio de la maduración de ovocitos caninos, ha contemplado básicamente, hasta la fecha, la evaluación del desarrollo meiótico y sólo en pocos estudios, la maduración citoplasmática mediante la evaluación cortical (De los Reyes *et al.*, 2005) o la descondensación espermática durante la fecundación (Saint-Dizier *et al.*, 2001), un estudio reciente describió ultraestructuralmente algunos cambios que ocurren durante la maduración *in vivo* en perras, basándose en características nucleares, citoplasmáticas y comunicativas entre el ovocito y células del cúmulo (Viaris de Lesegno *et al.*, 2007). Sin embargo, en ovocitos de otras especies como ratones (Calafell *et al.*, 1992), cabras (Villamediana *et al.*, 1999) y bovinos (Suzuki *et al.*, 1994), se ha visto en sistemas *in vitro* que la disposición del trabeculado que compone la ZP es más ancha y los agujeros menos profundos en los ovocitos madurados *in vitro*; lo que podría afectar la capacidad de unión

del espermatozoide durante la interacción de los gametos (Suzuki *et al.*, 1994; Villamediana *et al.*, 1999). En otras especies como humanos y cerdos no se describe, un cambio significativo en la estructura de la ZP luego de la maduración *in vitro* (Magerkurth *et al.*, 1999; Hiroyuki *et al.*, 2000).

En caninos, se ha demostrado *in vitro* que el espermatozoide puede unirse y penetrar ovocitos independiente del estado de maduración (Saint-Dizier *et al.*, 2001; Reynaud *et al.*, 2005; Reynaud *et al.*, 2006), sin embargo, se indicaría una diferencia en los porcentajes de penetración espermática entre ovocitos inmaduros y madurados en cultivo (De Los Reyes *et al.*, 2007^a). Estas diferencias podrían relacionarse a las características de la ZP durante la maduración; lo que estudia la presente memoria.

HIPÓTESIS

El proceso de maduración ovocitaria, inducida bajo condiciones *in vitro*, producirá cambios ultraestructurales en la zona pelúcida que pueden ser evaluados mediante microscopía electrónica.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar posibles cambios ultraestructurales de la zona pelúcida durante la maduración *in vitro* de ovocitos de perra.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar la ultraestructura del trabeculado de la zona pelúcida de ovocitos inmaduros y madurados *in vitro* en caninos.
- Estudiar el estado morfológico de la zona pelúcida de ovocitos de perra durante el proceso de maduración a través de dos tiempos de cultivo (72 y 96 horas).
- Evaluar el tamaño de los ovocitos con su ZP en estado inmaduro y sometidos a maduración en cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Las evaluaciones al microscopio electrónico de barrido (MEB), se hicieron en el laboratorio de la Facultad de Física de la P. Universidad Católica de Chile

a) Obtención y procesamiento de los ovocitos

Los ovarios se obtuvieron de perras sanas, entre 1-6 años de edad (Songsasen and Wildt., 2007; Hewitt and England., 1997) ovariectomizadas en la Unidad de Salud e Higiene Ambiental de la I. Municipalidad de La Pintana, los que fueron transportados al laboratorio a 37° C en solución salina (NaCl 0,9%), suplementada con 100 UI/mL de Penicilina y 50 µg/mL de Estreptomicina (Sigma).

En el laboratorio, los ovarios fueron macerados a través de cortes finos con hojas de bisturí en buffer PBS, con el objetivo de liberar a los ovocitos. Sólo se seleccionaron aquellos ovocitos, de mayor tamaño, que presentaron el citoplasma homogéneo y que estaban completamente rodeados por al menos tres capas de células del cúmulo (Farstad, 2000; De los Reyes *et al.*, 2005).

Se obtuvo un total de 93 ovocitos a través de 15 réplicas experimentales. Los ovocitos seleccionados en cada réplica fueron divididos en dos grupos: un grupo se incubó para maduración *in vitro* y el otro grupo se procesó inmediatamente en estado de ovocitos inmaduros.

Los ovocitos que se procesaron en estado inmaduros se lavaron en PBS para luego ser trasladados a una solución de citrato de sodio (0,05% en PBS) para la remoción de las células del cúmulo.

b) Maduración *in vitro*

Los ovocitos seleccionados para maduración, fueron lavados en PBS suplementado y luego procesados para su maduración *in vitro* de acuerdo a lo descrito por De los Reyes *et al.* (2005), el medio de incubación fue preparado con Tissue Culture Medium 199 (TCM 199; Earle's salts tamponada con 25 mM de Hepe; In Vitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, In Vitrogen), 10 UI/mL de gonadotrofina coriónica humana (hCG, Sigma) 5 μ L/mL solución antibiótica (Penicilina 0,0122 gr/mL-Estreptomicina 0,02 gr/mL, Sigma) y 2,5 μ L/mL de solución piruvato, preparada en base a 11.2 mg/mL de ácido pirúvico. Todos los medios preparados se filtraron utilizando una membrana de filtro 0,22 μ m (Millipore). El tiempo de maduración fue de 72 y 96 h.

En cada réplica experimental, por cada tiempo de maduración, se incubaron los ovocitos en gotas de 100 μ L del medio de cultivo, bajo aceite mineral estéril (Sigma) en cápsulas de cultivo (Falcon #3001). Los ovocitos se incubaron a 38,5°C, en una estufa de cultivo (Forma Scientific) en una atmósfera de 5% CO₂ y 98 % de humedad. Se utilizaron aproximadamente 30 ovocitos en cada tiempo de maduración (0, 72, 96 h).

c) Fijación de ovocitos

La fijación se realizó a ovocitos inmaduros y madurados *in vitro* posterior a la extracción de las células del cúmulo. Los ovocitos se lavaron en buffer Cacodilato 50 mM por 15 minutos y posteriormente se fijaron en glutaraldehído 2,5% mantenidos en esta solución a 4°C, hasta su procesamiento para microscopía electrónica de barrido.

d) Procesamiento y evaluación en Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Los ovocitos fueron lavados dos veces en PBS por cinco minutos y luego se transfirieron a una segunda solución fijadora de Tetroxido de Osmio al 2% por 30 minutos y posteriormente nuevamente lavados dos veces en PBS, por cinco minutos.

Los ovocitos fueron colocados en cámaras de cobre cerradas para ser deshidratados mediante concentraciones crecientes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% y 100%). Se realizaron tres pasajes de cinco minutos en cada una de las concentraciones de acetona.

Posteriormente, la desecación de los ovocitos se realizó mediante secado a punto crítico del CO₂, el cual pasa de fase líquido directamente a fase gas. Luego los ovocitos se montaron en portaespecímen para ser sombreados con oro-paladio. Las muestras fueron analizadas bajo el microscopio electrónico de barrido marca “LEO” modelo 1420 VP.

La medición del trabeculado de la zona pelúcida se llevó a cabo mediante el programa “AutoCad 2006”. Dicho programa permite que las fotografías tomadas por el MEB sean estandarizadas en referencia a un tamaño y luego medidas en micrómetros (μm) mediante un proceso de comparación entre pixeles (jpg) y vectores lineales (dwg).

f) Análisis Estadístico

En cada grupo de ovocitos (inmaduros, madurados por 72 y 96 h), se obtuvo un promedio por ovocito y un tamaño, los cuales se evaluaron a través de un análisis de varianza de un factor o clasificación simple, comparando las medias a través de la prueba de Tukey. Las diferencias de $P \leq 0,05$ se consideraron significativas.

El modelo estadístico será:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable a estudiar.

μ = Media poblacional.

T_i = Tiempo de incubación.

ϵ_{ij} = Error.

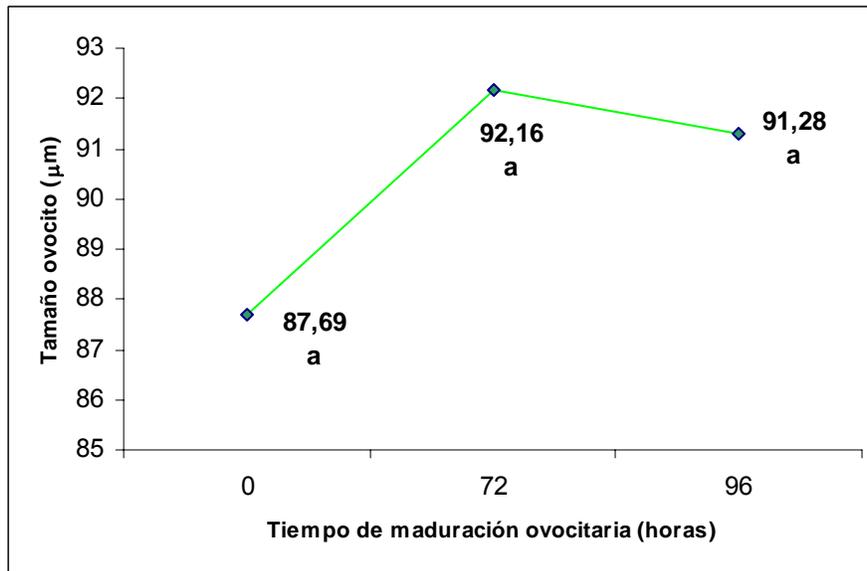
RESULTADOS

Se analizó bajo MEB la estructura y estado morfológico de la ZP a un total de 500 ovocitos, 93 ovocitos pudieron efectivamente ser evaluados, 30 de ellos correspondieron a ovocitos estado inmaduro, 31 a aquellos que se maduraron en cultivo por 72 h y 32 a 96 h. Los ovocitos restantes no pudieron ser medidos ya que presentaban alteraciones en su envoltura o estructura como endurecimiento de la ZP, ovocitos destruidos, partículas extrañas y material precipitado, también presencia de células del cúmulo que impiden observar la ZP (figura N°1, figura N°2 a y b, figura N°3 a y b).

Cada ovocito fue analizado y medido individualmente (figura N°4, a y b y figura N°5 a y b), obteniéndose un promedio en el tamaño del trabeculado de la ZP y el diámetro total del ovocito (anexo N°1). El estado morfológico se analizó a partir de las fotografías obtenidas del MEB, en los tres grupos de estudio la ZP se presenta como una red de filamentos con agujeros de diferentes tamaños, en el grupo de los ovocitos madurados *in vitro* se puede observar que los agujeros se encuentran superpuestos unos sobre otros. En los ovocitos inmaduros estos agujeros tienden a ser de un menor tamaño que en los ovocitos madurados y con aspecto de mayor profundidad (figura N°6, a, b y c).

En la gráfico N° 1 se muestran los promedios de tamaños en los ovocitos por grupo, en donde se puede apreciar una leve diferencia en los ovocitos inmaduros con respecto a los madurados, aunque no sea estadísticamente significativo.

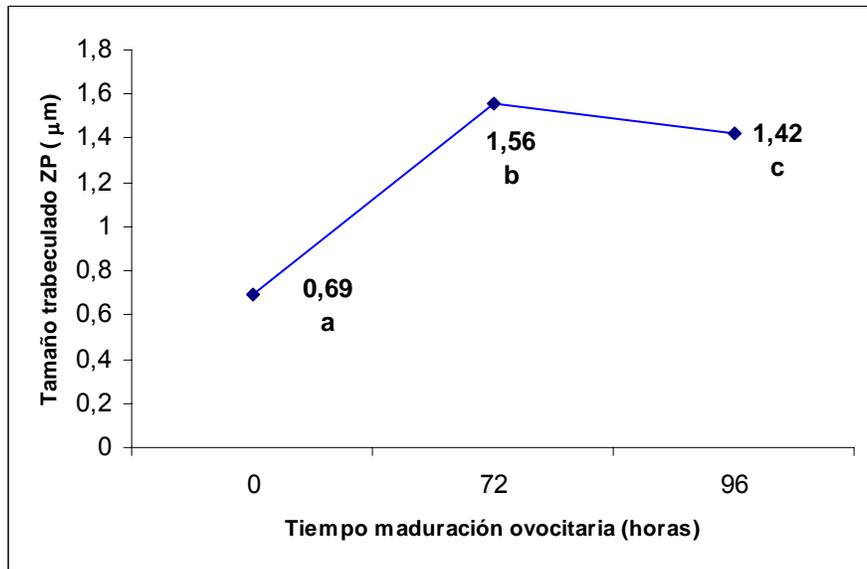
Gráfico N° 1. Promedio del tamaño total en cada grupo de ovocitos.



Letras iguales indican diferencias no significativas ($P > 0,05$)

El gráfico N° 2 muestra las diferencias en el tamaño del trabeculado obtenido en cada grupo de ovocitos. Los ovocitos inmaduros obtuvieron un menor tamaño ($P < 0,05$) en el trabeculado al ser comparados con los ovocitos madurados *in vitro*, valor que es representado en el gráfico por la letra “a”. A su vez, dentro de los ovocitos madurados *in vitro*, en los que se utilizó un protocolo de 72 h de maduración el promedio del tamaño en el trabeculado de la ZP fue mayor que aquellos ovocitos madurados con un protocolo de 96 h, representado en el gráfico por las letras “b” y “c”, respectivamente.

Gráfico N° 2. Diferencias en el tamaño del trabeculado en las distintas horas de maduración.



Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Las figuras N° 1, 2 y 3 muestran diferentes tipos de alteraciones encontradas en ovocitos inmaduros y madurados *in vitro*, del total de ovocitos evaluados aproximadamente el 80% se encuentran en este grupo; las figuras N° 4 y 5 muestran un ovocito sin alteraciones morfológicas y el análisis que se realizó tanto en el trabeculado de su ZP como en el tamaño total del ovocito. En la figura N°6 se observan las diferencias en el trabeculado en los diferentes ovocitos según estado de maduración, los ovocitos inmaduros presentan un trabeculado más uniforme con orificios profundos separados entre si por una estructura compacta, a diferencia de los madurados 72 y 96 h, donde se observa una estructura más desordenada y estratificada con orificios de diferentes tamaños y profundidades. Las imágenes se obtuvieron a partir de acercamientos realizados por el programa “Autocad 2006” a fotos de ovocitos tomadas por el MEB.

Figura N° 1 (1810 X) Alteraciones estructurales en ovocito madurado durante 72 h.

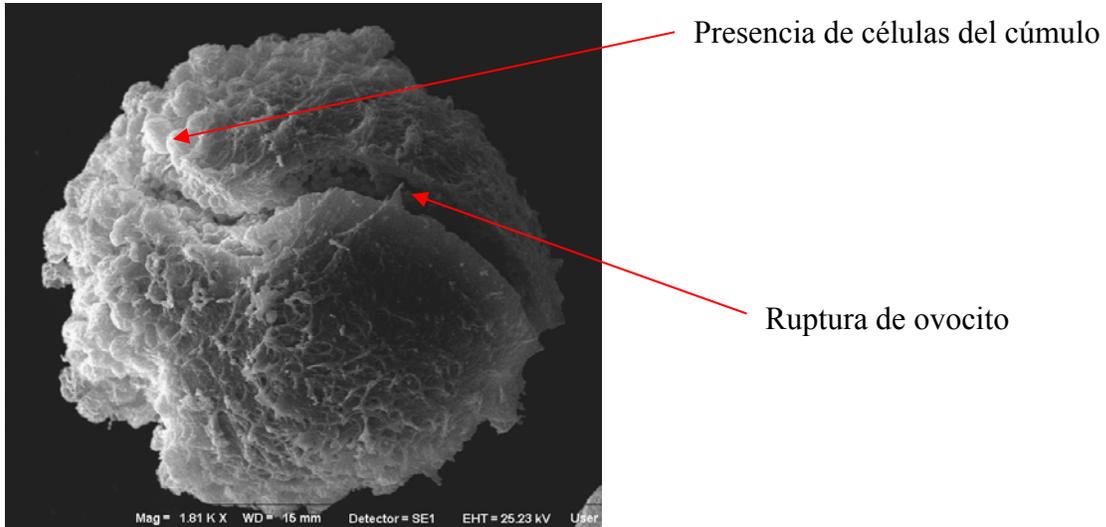


Figura N° 2 (5000 X). **2a** ovocito inmaduro con ZP alterada, no se puede apreciar el trabeculado, **2b** ovocito madurado durante 96 h con “endurecimiento de ZP”.

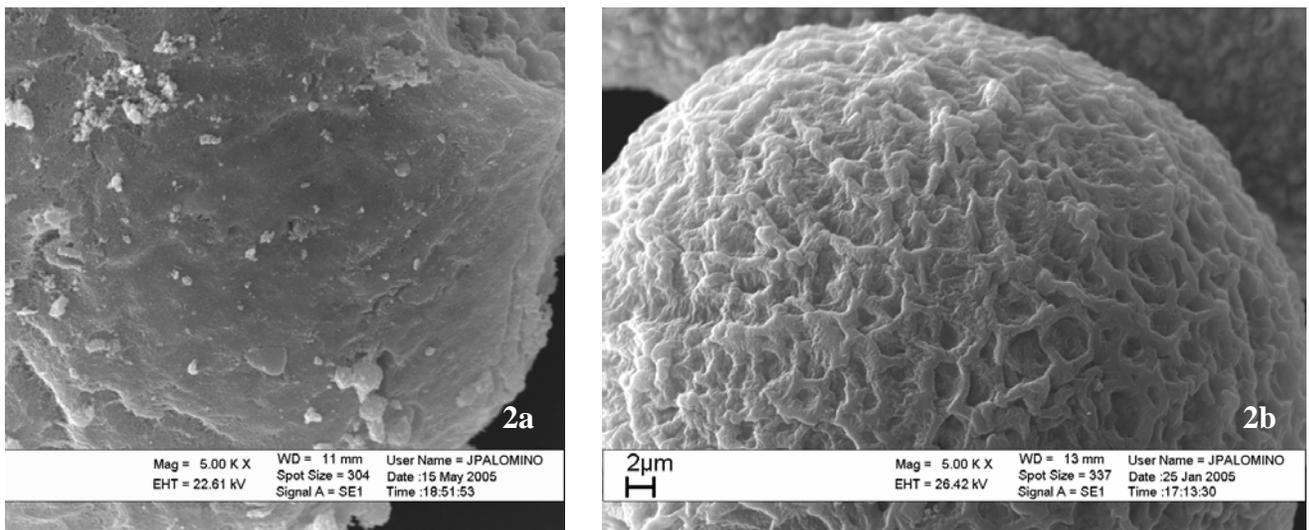


Figura N° 3 (5000 X). **3a** presencia de partículas de carácter desconocido, y bacterias producto de la contaminación en la preparación de las muestras, en un ovocito madurado durante 96 h, **3b** células del cúmulo que impide la visión de la ZP, en un ovocito madurado durante 72 h.

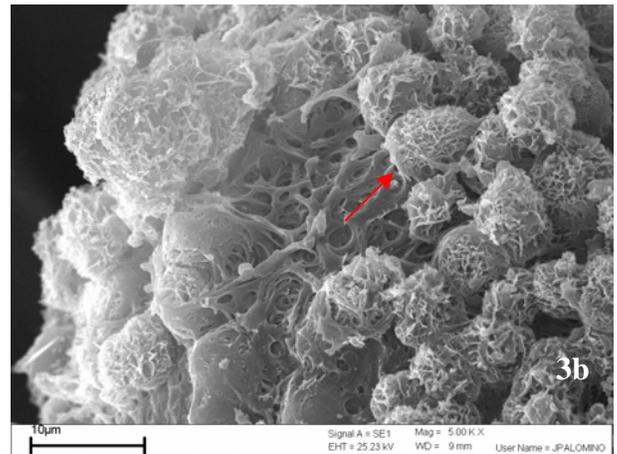
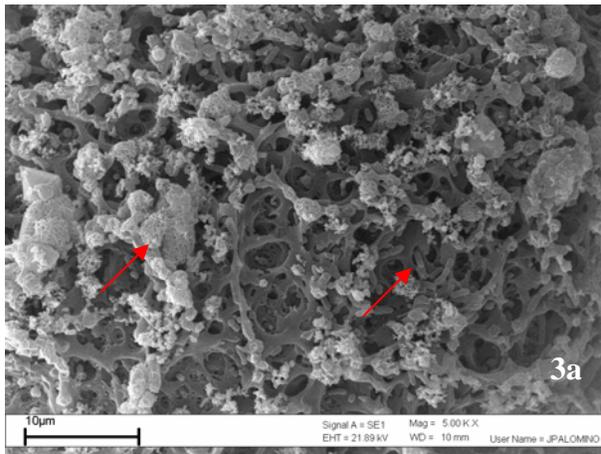


Figura N° 4 (5000 X), **4a** muestra ovocito maduro (96 h de cultivo) sin alteraciones en su ZP y **4b** acercamiento de la foto 4a mediante el programa “Autocad 2006” para mostrar detalle de las mediciones del trabeculado.

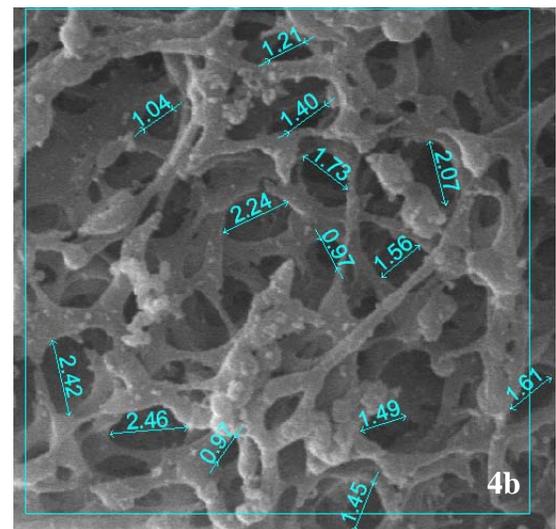
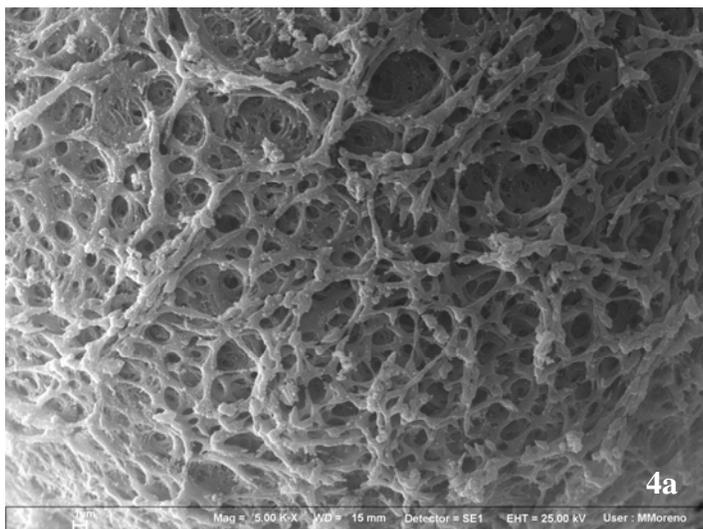


Figura N° 5 (1580 X) **1a** representa ovocito maduro (96 h de cultivo) sin alteraciones, **1b** la medición del tamaño (diámetro) del ovocito.

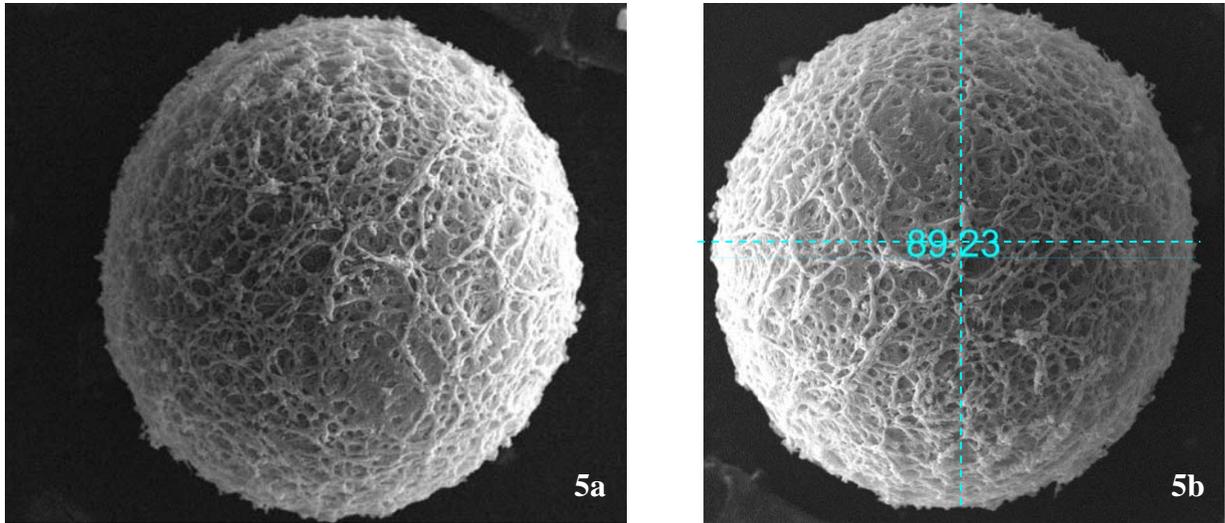
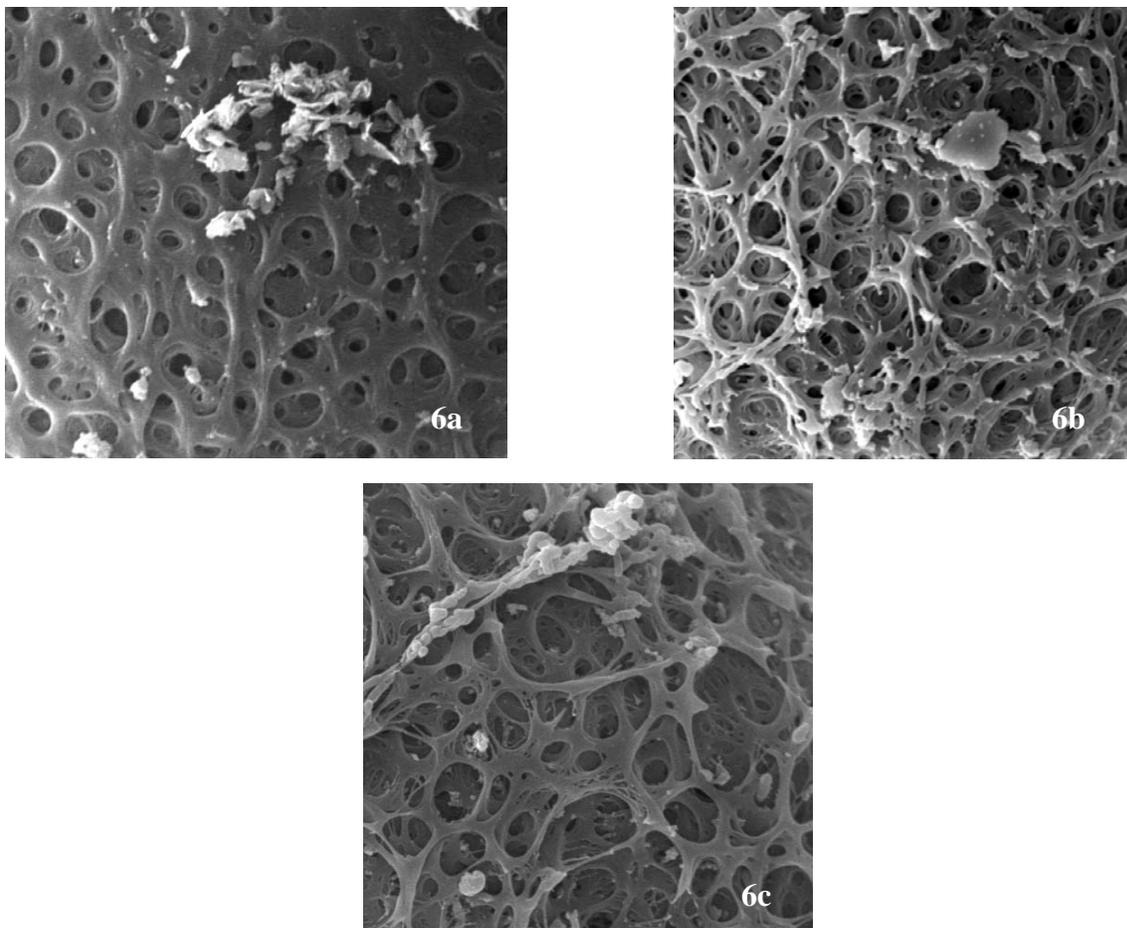


Figura N°6 (5000 X); **6a** detalle trabeculado ovocito inmaduro **6b** detalle trabeculado ovocito madurado 72 h, **6c** detalle trabeculado ovocito con 96 h de maduración.



DISCUSIÓN

Se pudo demostrar con este trabajo que existen cambios a nivel ultraestructural en la ZP del ovocito canino durante la maduración ovocitaria. Estos resultados serían coincidentes con estudios realizados en ovocitos de cabras (Villamediana *et al.*, 1999), bovinos (Suzuki *et al.*, 1994) y ratones (Calafell *et al.*, 1992), a diferencia de lo estudiado en ovocitos humanos (Magerkurth *et al.*, 1999). Los cambios observados en la ultraestructura de la ZP entre ovocitos inmaduros y madurados *in vitro* podrían corroborar que la ZP se comportaría como una estructura dinámica que cambia a través del tiempo durante la maduración. Al contrario, el tamaño del ovocito no presentó cambios significativos durante el tiempo de maduración en cultivo.

La ZP es una envoltura extracelular y tridimensional que envuelve a la mayoría de los ovocitos mamíferos (Yanagimachi, 1994; Wassarman *et al.*, 1996), compuesta por capas, con apariencia de red de filamentos y naturaleza porosa que permite el paso de ciertas moléculas (Yanagimachi, 1994; Sinowatz *et al.*, 2001), estas características morfológicas se repiten en la ZP de ratón y hámster (Phillips y Shalgi, 1980), cerdo (Flechon *et al.*, 2004), bovino (Suzuki *et al.*, 1994), cabras (Villamediana *et al.*, 1999), humano (Magerkurth *et al.*, 1999) y marsupiales (Breed *et al.*, 2002). Estudios realizados en ovocitos de perra inmaduros y mantenidos congelados o en soluciones salinas en estado inmaduro han comprobado que la ZP coincide en general con esta descripción (Ström Holst *et al.*, 2000), lo que se comprobó en este estudio, tanto en ovocitos inmaduros como madurados *in vitro*, al presentarse la ZP como una malla filamentosa organizada en diferentes estratos, fenestrada con muchos agujeros.

La ZP se comienza a formar durante el desarrollo del folículo primordial a folículo primario (Barber *et al.*, 2000), en el crecimiento ovocitario la ZP aumenta en grosor (Wassarman *et al.*, 1996; Viaris de Lesegno *et al.*, 2007) y durante la maduración, fecundación y desarrollo embrionario temprano, ocurren modificaciones a nivel ultraestructural y funcional. La ZP de ovocitos inmaduros de bovinos y cabras presenta un aspecto de una malla fibrosa uniforme con agujeros profundos y de pequeño tamaño (Suzuki *et al.*, 1998; Villamedia *et*

al., 1999), en este trabajo se pudo observar que la ZP en caninos tiene un aspecto similar, los agujeros son de pequeño tamaño, separados entre si por una estructura compacta, densa y poco estratificada, sin embargo una vez transcurrido 72 o 96 h de maduración hay un cambio morfológico en la ZP. En bovinos también se han encontrado diferencias entre ovocitos inmaduros y madurados *in vitro*, donde en los primeros la ZP se caracteriza por ser una malla fibrosa con numerosos y profundos agujeros, en los madurados en cultivo la ZP cambia a una apariencia mas delgada y los agujeros menos profundos (Suzuki *et al.*, 1994) lo que indicaría un posible efecto de la maduración sobre la ZP.

Comparando la maduración *in vivo* vs *in vitro*, se ha observado en cabras, que los ovocitos inmaduros presentaron una malla fibrosa con orificios pequeños y profundos, los ovulados, madurados *in vivo*, y madurados *in vitro* presentaron una ZP con apariencia de distintas capas y agujeros grandes con aspecto plano, es decir, poco profundos; y en ambos tipos de maduración se observaron cambios ultraestructurales en la ZP después de haber transcurrido la maduración, no encontrando diferencias en la ZP entre ovocitos madurados *in vivo* e *in vitro* (Villamedia *et al.*, 1999). Sin embargo, en cerdos, se encontraron diferencias en la ZP, debido posiblemente a una incompleta maduración de los últimos (Funahashi *et al.*, 2001).

En general, en el transcurso de la maduración ovocitaria se producen distintos cambios que tienen como consecuencia permitir la fecundación y un desarrollo embrionario normal (Fulka *et al.*, 1998, Mehlmann, 2005). Estos cambios estarían asociados a la estrecha comunicación existente entre el ovocito y las células del cúmulo que lo rodean, mediante uniones de comunicación (“gap junctions”) (Hiroyuki *et al.*, 2000; Sun y Nagai, 2003). En la perra y otras especies mamíferas, estas células emiten proyecciones citoplasmáticas que atraviesan la ZP por los agujeros que esta presenta para alcanzar la membrana ovocitaria y permitir el intercambio de sustancias comprometidas en la maduración (Suzuki *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1998; Villamedia *et al.*, 1999; Flechon *et al.*, 2004; Viaris de Lesegno *et al.*, 2007). Después del alza de LH estas proyecciones se irían degenerando, perdiéndose la comunicación y produciendo un cambio estructural en la ZP (Villamedia *et al.*, 1999;

Hiroiyuki *et al.*, 2000). En ovocitos de perra estudiados *in vivo*, se ha visto que a medida que avanzan los días pos ovulación, estas proyecciones se van degenerando quedando el ovocito incomunicado a las 72 h después de la ovulación, cuando se completaría la maduración nuclear (Viaris de Lesegno *et al.*, 2007) .

En este estudio, los cambios morfológicos observados después de la maduración tienen relación a un aumento del tamaño de los agujeros y a una apariencia menos profunda y un mayor número de capas en la ZP. Esto podría ser consecuencia de la mucificación y desacoplamiento de las células del cúmulo con la degeneración de las proyecciones emitidas hacia el ovocito (Villamedia *et al.*, 1999; Hiroiyuki *et al.*, 2000; Viaris de Lesegno *et al.*, 2007). Susuki *et al.*, (1994), propone que tanto la expansión de las células del cúmulo como el cambio de morfología de la ZP después de la maduración corresponde a un evento fisiológico que tiene como consecuencia guiar al espermatozoide hacia y a través de la ZP para alcanzar y fecundar al ovocito.

Al ser la ZP la envoltura externa del ovocito, el espermatozoide debe atravesar esta estructura para tomar contacto con la membrana plasmática del ovocito y lograr fusionarse a ella para penetrar al citoplasma ovular (Barros *et al.*, 1996). Cualquier cambio en la estructura y funcionalidad de la ZP, estaría por tanto afectando la penetración espermática y la fecundación normal (Barros *et al.*, 1996; Wassarman *et al.*, 1996; Sinowatz *et al.*, 2001; Gardner y Evans, 2006).

Estudios *in vitro* han observado que en caninos la penetración espermática sería independiente del estado de maduración del ovocito o el estado degenerativo de la ZP (Mahi y Yanagimachi, 1976; Saint-Dizier *et al.*, 2001); sin embargo, la frecuencia de penetración de ovocitos inmaduros es mayor en sistemas *in vitro* que *in vivo*, lo que podría ser consecuencia del uso de sistemas de cultivos sub óptimos en la maduración o la utilización de ovocitos con cierto grado de daño, que estuvieran alterando o influyendo en el estado morfológico de la ZP y la normal penetración espermática (Reynaud *et al.*, 2005; Reynaud *et al.*, 2006). En la perra, se ha descrito que la penetración espermática *in vivo*

ocurre sólo en metafase II, es decir cuando el ovocito ha completado su maduración nuclear (Reynaud *et al.*, 2005).

En ovocitos caninos inmaduros y madurados *in vitro*, se ha encontrado diferencias en el porcentaje de penetración (De los Reyes *et al.*, 2007^a). Esos resultados muestran que ovocitos inmaduros poseen un menor porcentaje de penetración que aquellos madurados en sistemas de cultivo, lo que podría estar asociado a cambios morfológicos y funcionales de la ZP, ya que el aumento del tamaño de los orificios junto con la disminución en la profundidad de algunos de ellos se ha relacionado con la mayor penetración espermática (Suzuki *et al.*, 1994; Villamedia *et al.*, 1999).

El tiempo de maduración *in vitro* del ovocito canino es aun controversial, ciertos autores han planteado que la mayor proporción de ovocitos con desarrollo meiótico se lograría durante las 24-48 horas (Nickson *et al.*, 2003; Saint-Dizier *et al.*, 2001); otros entre las 72 y 96 horas de cultivo (Mahi y Yanagimachi, 1976; Yamada *et al.*, 1992; Fuji *et al.*, 2000; De los Reyes *et al.*, 2005). Comparando los dos tiempos de maduración *in vitro* empleados en este trabajo, se observó mayor tamaño de agujeros en el trabeculado de la ZP de ovocitos madurados por 72 h en comparación a aquellos madurados por 96 h. En estudios previos, empleando los mismos medios y sistemas de maduración ovocitaria que los utilizados en este trabajo por 72 y 96 h, se observó que en los ovocitos madurados por 72 h, los porcentajes de penetración con espermatozoides de perros incubados por distintos tiempos de capacitación, fue mayor que en los ovocitos madurados por 96 h (Oberli, 2006), lo que podría estar relacionado con los agujeros de mayor tamaño a las 72 h encontrados en el presente estudio. Posiblemente exista por tanto, una estrecha relación entre el trabeculado de la ZP, el grado de maduración y como consecuencia una influencia en la penetración espermática.

A pesar que se han obtenido porcentajes mayores de maduración nuclear (ovocitos metafase II) *in vitro* a las 96 horas de cultivo versus 72 h (De los Reyes *et al.*, 2005), los porcentajes de penetración y fecundación *in vitro* son menores en ese tiempo (Oberli, 2006). Es posible, que a las 96 h exista una sobre maduración del ovocito, que se traduzca

en parte, por una disminución en el tamaño de los agujeros del trabeculado de la ZP, limitando la penetración del espermatozoide. La prolongación de los tiempos de cultivo, podría aumentar diversos grados de degeneración (Luvoni *et al.*, 2003).

Se ha descrito, por otra parte, que la mayor proporción de ovocitos madurados, evaluados a nivel nuclear (Metafase II), se logra entre las 48-72 h y que al extender el tiempo de cultivo no habría diferencias en la proporción de ovocitos madurados viables (Otoi *et al.*, 2004). Diferencias en la viabilidad de ovocitos de perra en cultivo tampoco se han encontrado luego de 96 h (De Los Reyes *et al.*, 2007^b). En este estudio un 21% del total de ovocitos madurados durante 96 h de cultivo, no presentaban alteraciones morfológicas evidentes, sin embargo, ultraestructuralmente presentaron un cambio en su trabeculado, al disminuir el tamaño de los agujeros, lo que podría afectar la interacción de los gametos pudiendo ser indicativo de un inicio de degeneración celular, que precedería a cambios más evidentes que afecten la viabilidad. Un mayor éxito de la fecundación *in vitro* se obtendría después de haber utilizado un protocolo de 48 h de maduración ovocitaria (Otoi *et al.*, 2004). Posiblemente, la ZP presenta un cambio morfológico entre las 0-72 h que beneficiaría la penetración espermática y como consecuencia la fecundación, donde tiempos mayores de cultivo podrían tener un efecto negativo sobre este proceso.

El tamaño ovocitario también podría experimentar algún cambio durante y después de la maduración. Viaris de Lesegno *et al.*, (2007), mencionan diferencias en el tamaño entre ovocitos caninos preovulatorios, inmaduros ovulados y madurados *in vivo*. Los ovocitos no ovulados presentarían un tamaño similar con aquellos que ya habían madurado, a diferencia de los ovocitos inmaduros en estado de vesícula germinal, que tendrían un menor tamaño. En este estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los ovocitos inmaduros y madurados *in vitro* (72-96 h) el espacio perivitelino comienza a ensancharse entre la ZP y la membrana plasmática del ovocito después de la ovulación para completarse antes del reinicio miótico, (Suzuki *et al.*, 1998; Viaris de Lesegno *et al.*, 2007). Pero probablemente, este cambio haya sido muy sutil, lo que no permitió detectar diferencias estadísticas entre las diferentes poblaciones de ovocitos evaluadas aquí.

Por otro lado, durante la maduración *in vitro* y la preparación de los ovocitos para analizarlos se producen distintos tipos de alteraciones a nivel ovocitario, en este estudio se encontraron en los tres tiempos de cultivo ovocitos degenerados, rotos, con pérdida de citoplasma y/o pérdida total o parcial de la ZP. La ZP y el ovocito son estructuras muy hidratadas por lo cual se pueden dañar fácilmente con la preparación para microscopía electrónica (Phillips *et al.*, 1980), es por ello que es común encontrar en este tipo de trabajos ovocitos que han sido completamente destruidos o han perdido parte importante de su estructura (Phillips *et al.*, 1980; Suzuki *et al.*, 1994; Villamedia *et al.*, 1999; Magerkurth *et al.*, 1999; Hiroyuki *et al.*, 2000).

La presencia de ovocitos degenerados, sin embargo, puede ser un fenómeno natural y no siempre una consecuencia de la preparación para microscopía o de un medio de cultivo ineficiente (Villamedia *et al.*, 1999). En sistemas *in vivo* antes de la ovulación hay una selección de los ovocitos, *in vitro* esta selección natural se pierde al utilizar técnicas de recolección como la obtención de gametos desde el tejido ovárico (Villamedia *et al.*, 1999; Fujii *et al.*, 2000; Otoi *et al.*, 2002), donde una cantidad variable de ovocitos se encuentran en crecimiento o estados tempranos de degeneración por atresia folicular (Fastard, 2000).

El “endurecimiento de la ZP” o reacción de zona, ocurre naturalmente después de la fecundación por la liberación del contenido de los gránulos corticales que modifican la superficie de la ZP, haciéndola refractaria a la penetración espermática (Schroeder *et al.*, 1990; Ducibella *et al.*, 1990; Suzuki *et al.*, 1996; Dell Aquila *et al.*, 1999). Este “endurecimiento” espontáneo se puede producir durante la maduración ovocitaria por la liberación prematura del contenido granular, tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* (Ducibella *et al.*, 1990; Dell Aquila *et al.*, 1999). Cuando se produce la reacción cortical, la ZP en ovocitos de cerdos y humanos cambia su ultraestructura de una malla fenestrada con muchos agujeros a una estructura lisa y de aspecto uniforme (Nikas *et al.*, 1994; Funahashi *et al.*, 2000). En este estudio se encontraron ovocitos con estas características en ambos tiempos de cultivo (72-96 h), donde la estructura de la ZP se había perdido completamente y sólo se podía observar una capa lisa con algunas depresiones pero sin agujero.

Se ha descrito que también es posible encontrar diferencias en la ZP de ovocitos madurados *in vivo* e *in vitro* (Funahashi *et al.*, 2001). En cerdos se ha observado diferencias ultraestructurales a nivel de la ZP entre los ovocitos madurados *in vivo* e *in vitro* (Funahashi *et al.*, 2000; Funahashi *et al.*, 2001), el aspecto de malla estratificada con numerosos agujeros que presenta la ZP de ovocitos madurados *in vivo* se torna lisa y de apariencia uniforme en los ovocitos madurados *in vitro*, donde muchos de los agujeros presentan remanentes citoplasmáticos de las proyecciones de las células del cúmulo, posiblemente debido a una incompleta maduración de la ZP (Funahashi *et al.*, 2000; Funahashi *et al.*, 2001). En el presente estudio se encontraron algunas células del cúmulo unidas a ovocitos pero a diferencia de otros animales, en caninos, la capa más interna de células del cúmulo permanece adherida firmemente al ovocito hasta completar la maduración ovocitaria, después de la ovulación (Farstad, 2000; Luvoni, 2000; Viaris de Lesegno *et al.*, 2007), sin embargo es probable que un porcentaje de los ovocitos madurados en cultivo hayan tenido algún grado de inmadurez, presentando características morfológicas en su ZP como apariencia lisa, uniforme y bajo porcentaje de agujeros y estratificación.

En el presente estudio se comprobó que durante la maduración ovocitaria *in vitro* se producen cambios a nivel ultraestructural en la ZP, estos cambios podrían tener un efecto en la penetración del espermatozoide en el ovocito. El espermatozoide antes de hacer contacto y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito, debe interactuar y atravesar la ZP, es por ello la importancia de las características estructurales que influyen en su función durante la fecundación.

CONCLUSIONES

- La ZP de ovocitos inmaduros y madurados *in vitro* por 72 y 96 h presentarían diferencias ultraestructurales.
- La duración del tiempo de maduración influiría en la ultraestructura de la ZP, tiempos mayores a 72 horas de cultivo disminuyen el tamaño de los agujeros presentes en la ZP.
- El tamaño ovocitario no presentaría cambios significativos durante la maduración *in vitro*.
- Debido a la maduración *in vitro* y la preparación para microscopía electrónica se produce en un alto porcentaje de ovocitos distintos tipos de alteraciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. **AVILES, M; JABER, L; CASTELLS, M.T; KAN, F.K.W; BALLESTA, J.** 1996. Modification of the lectin binding pattern in the rat zona pellucida after in vivo fertilization. *Molecular Reproduction and Development* 44: 370-381
2. **BARBER M.R, LEE S.M, STEFFENS W.L, ARD M, FAYRER HOSKEN R.A.** 2001. Immunolocalization of zona pellucida antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses, and elephants. *Theriogenology* 55: 1705-1717
3. **BARROS, C; CROSBY, J.A; MORENO, R.D.** 1996. Early steps of sperm-egg interactions during mammalian fertilization. *Cell Biology Internacional* 1: 33-39.
4. **BARROS, C; YANAGIMACHI, R.** 1971. Induction of zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. *Nature* 233: 268-269.
5. **BLACKMORE, D G, BAILLIE, L R, HOLT, J E, DIERKX, L, AITKEN, R J, McLAUGHLIN, E A.** 2004 Biosynthesis of the canine zona pellucida require the integrated participation of both oocytes and granulose cells. *Biology of Reproduction* 72: 661-668.
6. **BREED W. G; HOPE, R.M; WIEBKIN, O.W; SPARGO, S.C; CHAPMAN, J.A.** 2002. Structural organization and evolution of the marsupial zona pellucida. *Reproduction* 123: 13-21.
7. **BREWIS, I.A.; MORTON, I.E.; MOORE, H.D; ENGLAND, G.C.** 2001. Solubilized zona pellucida proteins and progesterone induce calcium influx and the acrosome reaction in capacitated dog spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 60:491- 497.
8. **CALAFELL J.M; NOGUES, C; PONSA, M; SANTALO, J; EGOZCUE, J.** 1992. Zona pellucida surface of immature and in vitro matured mouse oocytes: Analysis by scanning electron microscopy. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 4: 365-367.
9. **CORTÉS, C.; CODELIA, V.; MANOSALVA, I.; DE LANGE, J.; MORENO R.D.; DE LOS REYES, M.** 2006. Proacrosin and acrosin quantification as a tool for the evaluation of acrosome integrity in fresh and frozen dog spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 93 (1-2): 165-175

10. **DOWNS, S.M.** 1993. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogenology* 39: 65-79.
11. **DE LOS REYES, M.; BARROS, C.** 2000. Immunolocalization of proacrosin / acrosin in bovine sperm and sperm penetration through the zona pellucida. *Animal Reproduction Science* 58: 215 – 228.
12. **DE LOS REYES, M; DE LANGE, J; MIRANDA, P; PALOMINO, P; BARROS, C.** 2005. Effect of human chorionic gonadotropin supplementation during different culture periods on in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 64: 1-11.
13. **DE LOS REYES, M; PALOMINO, DE LANGE, J; BARROS, C.** 2007^a. In vitro sperm penetration through of immature an in vitro matured oocytes using fresh, chilled and frozed canine semen. *Animal Reproduction Science* (en prensa).
14. **DE LOS REYES, M; PALOMINO, J; MIRANDA P.; SEPÚLVEDA, S.; PARRAGUEZ, V.; BARROS, C.** 2007^b. Evaluation of cortical granules and viability evaluation during in vitro maturation of bitch oocytes subjected a long-term culture periods. *The Veterinary Record* 160: 196-198.
15. **DELL AQUILLA M.E, DE FELICI M, MASARI S, MARITATO F, MINOIA P.** 1999. Effects of fetuin on zona pellucida hardening and fertilizability of equine oocytes matured in vitro. *Biology of Reproduction* 61: 533-540.
16. **DUCIBELLA T, KURASAWA S, RANGARAJAN S, KOPF G, SCHULTZ R.** 1990. Precocious loss of cortical granules during mouse oocytesmeiotic maturation and correlation with an egg-induced modification of the zona pellucida. *Developmental Biology* 137: 46:55.
17. **EPPIG J J.** 2001. Oocyte control of ovarian follicular developmental and function in mammals. *Reproduction* 122: 829-838.
18. **FARSTAD, W.** 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 53: 175 – 186.
19. **FLECHON, J.E; KOPECNY, V; PIVKO, J; PAVLOK, A; MOTLIK, J.** 2004. Texture of the zona pellucida of the mature pig oocytes. The mammalian egg envelope revisited. *Reproduciton Nutrition Development* 44: 207-218.

20. **FUJII, M.; OTOI, T.; MURAKAMI, M.; TANAKA, M.; UNE, S.; SUZUKI, T.** 2000. The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. *Journal of Veterinary Medical Science* 62:305-307.
21. **FULKA, J; FIRST, N.L; MOOR, R.M.** 1998. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocytes maturation. *Molecular Human Reproduction* 1: 41-49.
22. **FUNAHASHI, H; EKWALL, H; KIKUSHI, K; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.** 2000. Zona reaction in porcine oocytes fertilized *in vivo* and *in vitro* as seen with scanning electron microscopy. *Biology of Reproduction* 63: 1437-1442.
23. **FUNAHASHI, H; EKWALL, H; KIKUSHI, K; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.** 2001. Transmission electron microscopy studies of the zona reaction in pig oocytes fertilized *in vivo* and *in vitro*. *Reproduction* 122: 443-452.
24. **GARDNER, A.J; EVANS, J.P.** 2006. Mammalian membrane block to polyespermy: new insights into how mammalian eggs prevent fertilization by multiple sperm. *Reproduction Fertility and Development* 18: 53-61.
25. **HEWITT, D.A; ENGLAND G.C.W.** 1997. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation *in vitro*. *Theriogenology* 49: 957-966.
26. **HIROYUKI, S; BYEONG-SEON, J; XIANGZHONG, Y.** 2000. Dynamic changes of cumulus-oocytes cell communication during *in vitro* maturation of porcine oocytes. *Biology of Reproduction* 63: 723-729.
27. **HOODBHOY, T; TALBOT, P.** 1994. Mammalian Cortical Granules: Contents Fate, and Function. *Molecular Reproduction and Development* 39:439-448.
28. **JONES, R.** 1991. Interaction of zona pellucida glycoproteins, sulphated carbohydrates and synthetic polymers with proacrosin, the putative eggbinding protein from mammalian spermatozoa. *Development* 111: 1155-1163.
29. **LUVONI, G.** 2000. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: *in vitro* embryo production. *Reproduction Nutrition and Development* 40: 505 – 512.
30. **LUVONI, G.C; CHIGIONI, S; ALLIEVI, E; MACIS, D.** 2003. Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. *Reproduction Domestic Animal* 38: 410-414.

31. **MAGERKURTH, C; TÖPFER-PETERSEN, E; SCHWARTZ, P; MICHELMANN, H.W.** 1999. Scanning electron microscopy analysis of the human zona pellucida: influence of maturity and fertilization on morphology and sperm binding pattern. *Human Reproduction* 4:1057-1066.
32. **MAHI, C. A.; YANAGIMACHI, R.** 1976. Maturation and Sperm Penetration of Canine Ovarian Oocytes *In Vitro*. *Journal of Experimental Zoology* 196: 189-196.
33. **MEHLMANN L.M.** 2005. Stop and start in mammalian oocytes: recent advancement in understanding the regulation of meiotic arrest and oocytes maturation. *Reproduction* 130: 791-799.
34. **MIYANO, T.** 2005. In vitro growth of mammalian oocytes. *Journal of Reproduction and Development* 51: 169-176.
35. **NIKAS, G; PARASCHOS, T; PSCHOYOS, A; HANDYSIDE, A.H.** 1994. The zona reaction in human oocytes as seen with scanning electron microscopy. *Human Reproduction*. 9: 2135-2138.
36. **NICKSON, D. A.; BOYD, J. S.; ECKERSHALL, P. D.; FERGUSON, J. M.; HARVEY, M. J.; RENTON, J. P.** 1993. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitches. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 44: 231 – 240.
37. **OBERLI, R.** 2006. Evaluación del tiempo de capacitación espermática en la fecundación *in vitro* en caninos. Tesis para optar al Título Profesional de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Departamento de Fomento de la Producción Animal.
38. **OTOI, T.; FUJII, M.; TANAKA, M. OOKA, A.; SUZUKI, T.** 2000. Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology* 54:535-542.
39. **OTOI, T; OOKA, A; MURAKAMI, M; KURNIANI KARJA, N.W; SUZUKI, T.** 2001. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrus cycles. *Reproduction Fertility and Development* 13: 151-155.

40. **OTOI, T; WILLINGHAM, L; SHIN, T; KRAEMER, D.C; WESTHUSIN, M.** 2002. Effects of oocytes culture density on meiotic competence of canine oocytes. *Reproduction* 124: 775-781.
41. **OTOI, T; SHIN, T; KRAEMER, D.C; WESTHUSIN, M.E.** 2004. Influence of maturation culture period on the development of canine oocytes after in vitro maturation and fertilization. *Reproduction Nutrition Development* 44: 631-637.
42. **OTOI, T; SHIN, T; KRAEMER, DC; WESTHUSIN, ME.** 2007. Role of cumulus cells on in vitro maturation of canine oocytes. *Reproduction Domestic Animal* 42: 184-189.
43. **PHILLIPS, D.M; SHALGI, R.** 1980. Surface architecture of the mouse and hamster zona pellucida and oocytes. *Journal of Ultrastructure Research* 72: 1-12.
44. **QIAN, Y; SHI, W.Q; DING, J.T; SHA, J.H; FAN, B.Q.** 2003. Predictive value of the area of expanded cumulus mass on development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Journal of Reproduction and Development* 49: 167-174.
45. **REYNAUD, K; FONTBONNE, A; MARSELOO, N; THOURMIRE, S; CHEBROUT, M; VIARIS DE LESEGNO, C; CHASTANT-MAILLARD, S.** 2005. In vivo meiotic resumption fertilization and early embryonic development in the bich. *Reproduction* 130: 193-201.
46. **REYNAUD, K; FONTBONNE, A; MARSELOO, N; VIARIS DE LESEGNO, C; SAINT-DIZIER, M; CHASTANT-MAILLARD, S.** 2006. In vivo canine oocytes maturation fertilization and early embryogenesis: A review. *Theriogenology* 66: 1685-1693.
47. **RODRIGUES B.A; RODRIGUES J.L.** 2006. Responses of canine to in vitro maturation and in vitro fertilization outcome. *Theriogenology* 66: 1667-1672.
48. **SAINT-DIZIER, M; RENARD, JP; CHASTANT-MAILLARD, S.** 2001. Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. *Reproduction* 121: 97-105.
49. **SÁNCHEZ, A; DE LOS REYES, M.** 2004. Zona pellucida: an extracellular matrix with applications in the study of immunocontraception in domestic carnivores. *Revista Científica; FCV-LUZ* 14: 444-450.

50. **SCHROEDER, A.C; SCHULTZ, R.M; KOPF, G.S; TAYLOR, F.R; BECKER, R.B; EPIG J.J.** 1990. Fetuin inhibits zona pellucida hardening and conversion of ZP2 to ZP2f during spontaneous mouse oocytes maturation in vitro in the absence of serum. *Biology of Reproduction* 43: 891-897.
51. **SINOWATZ, F; TÖPFER-PETERSEN, E; KÖLLE, S; PALMA, G.** 2001. Functional morphology of the zona pellucida. *Anatomy, Histology, Embryology* 30: 257-263.
52. **SONGSASEN, N; WILDT, DE.** 2005. Size of the donor follicle, but not stage of reproductive cycle or seasonality, influences meiotic competency of selected domestic dog oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 72: 113-119.
53. **SONGSASEN, N; WILDT, D.E.** 2007. Oocytes biology and challenges in developing in vitro systems in the domestic dog. *Animal Reproduction Science* 98: 2-22.
54. **STRÖM-HOLST, B; LARSSON, B; LINDE-FORSBERG, C; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.** 2000. Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* 119: 77-83.
55. **SUN, Q.S; NAGAI, T.** 2003. Molecular Mechanisms Underlying Pig Oocytes Maturation and Fertilization. *Journal of Reproduction and Development* 49: 347-359.
56. **SUTTON-MCDOWALL, M.L; GILRICHT, R.B; THOMPSON, J.G.** 2004. Cumulus expansion and glucose utilization by bovine cumulus-oocyte complex during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. *Reproduction* 128: 313-319.
57. **SUZUKI, H; YANG, X; FOOTE, R.H.** 1994. Surface alteration of the bovine oocytes and its investments during and after maturation and fertilization in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 38: 421-430.
58. **SUZUKI, H; PRESICCE, G.A; YANG, X.** 1998 Differential surface ultrastructural characteristic and volumetric dynamics of bovine oocytes during maturation in vivo versus in vitro. *Journal Mammals* 15: 42-49.
59. **TÖPFER - PETERSEN, E.; PETROUNKINA, A. M.; EKHLASI - HUNDRIESER, M.** 2000. Oocyte – sperm interactions. *Animal Reproduction Science* 60 – 61: 653 – 662.

60. **VIARIS DE LESEGNO, CH; REYNAUD, K; PECHOUX, CH; THOUMIRE, S; CHASTANT-MAILLARD, S.** 2007. Ultraestructure of canine oocytes during in vivo maturation. *Molecular Reproduction and Development* 52: 310-318.
61. **VILLAMEDIANA, P; RUTTLAND, J; LÓPEZ-BÉJAR, MA; VIDAL, F; PARAMIO, M.T.** 1999. Changes in Zona Pellucida Surface alter in vivo and in vitro Maturation of Caprine Oocytes. *Reproduction Domestic Animal* 34: 417-421.
62. **WASSARMAN, P. M; LIU, CH; LITSHER, E.S.** 1996. Constructing the mammalian egg zona pellucida: some new pieces of an old puzzle. *Journal of Cell Science* 109: 2001-2004.
63. **WILLINGHAM-ROCKY, L.A; HIMRICHS, K; WETHUSIN, M.E; KRAEMER, D.C.** 2003. Effects of stage of oestrus cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes in vitro. *Reproduction* 126: 501-508.
64. **YAMADA , S; SHIMAZU, Y; KAWAJI, H; NAKAZAWA, M; NAITO, K; TOYODA, Y.** 1992. Maturation, fertilization, and development of dog oocytes in vitro. *Biology of Reproduction* 46: 853-858.
65. **YANG, X; KUBOTA, C; SUZUKI, H; TANEJA, M; BOLS, P.E.J; PRESICCE, C.A.** 1998. Control of oocyte maturation in cows biological factors. *Theriogenology* 49: 471-482.
66. **YANAGIMACHI.** 1971. Induction of the zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. *Nature* 233: 268-269.
67. **YANAGIMACHI, R.** 1994. Mammalian fertilization. En: Knobil, E. y Neill, J.D. (eds). *The Physiology of reproduction*. 2ª ed. Editorial Raven Press. Nueva York. USA. pp. 189-317.

ANEXOS

Anexo N° 1. Promedios del tamaño de los agujeros en la ultra estructura de la ZP de ovocitos caninos inmaduros y madurados *in vitro* y tamaño total de cada ovocito medido.

Numero Ovocito	Ovocitos Madurados (horas)					
	Inmaduro 0 horas		72 horas		96 horas	
	Tamaño trabeculado (µm)	Tamaño ovocito	Tamaño trabeculado (µm)	Tamaño ovocito (µm)	Tamaño trabeculado (µm)	Tamaño ovocito (µm)
1	0,822272727	63,13	1,536875	114,17	1,232826087	69,42
2	0,767789474	100,35	1,43195122	93,09	1,912258065	66,51
3	0,900365854	89,17	1,13972973	99,44	1,225747126	116,22
4	0,733815789	61,33	1,38	101,57	1,051444444	121,01
5	0,718	109,1	1,080240964	102,59	1,157904762	106,98
6	0,721466667	109,56	1,244166667	84,13	1,200243902	91,07
7	0,856179775	98,68	1,57009901	97,19	1,493173077	104,74
8	0,901111111	89,98	1,38954023	99,57	1,114333333	93,31
9	0,586428571	98,21	1,517333333	94,49	0,937666667	100,59
10	0,769896907	102,6	1,381333333	101,89	1,399333333	86,78
11	0,822777778	88,6	1,510512821	90,36	1,368666667	90,38
12	0,757962963	102,25	1,725888889	91,51	1,452	97,4
13	0,712621359	82,49	1,506111111	86,76	1,362888889	100,13
14	0,59411215	93,93	1,817333333	94,02	1,344819277	82,32
15	0,55245283	82,92	1,662197802	92,44	1,108222222	82,12
16	0,576944444	86,23	1,597666667	87,92	1,294888889	107,07
17	0,571759259	88,15	1,674320988	77,91	1,366777778	87,71
18	0,77254902	72,33	1,675888889	79,59	1,205	81,19
19	0,47816092	92,78	1,587125	80,53	1,365934066	80,32
20	0,552962963	87,29	1,631785714	100,45	1,394	81,32
21	0,54462963	75,22	1,731111111	89,39	1,236049383	92,44
22	0,648518519	84,17	1,738372093	95,32	2,067222222	89,23
23	0,589705882	93,96	1,475	102,5	1,89974026	102,32
24	0,529166667	95,26	1,715974026	103,28	1,778055556	84
25	0,658392857	86,49	1,507631579	72,39	1,635714286	82,46
26	0,908796296	74,77	1,452739726	87,74	1,358688525	98,88
27	0,70728972	73,56	1,732531646	89,53	1,798289474	82,03
28	0,582537037	83,58	1,781780822	84,51	1,722972973	101,17
29	0,659294118	86,16	1,590117647	91,58	1,622238806	92,02
30	0,675696203	78,56	1,585526316	83,55	1,588243243	80,24
31			1,929176471	87,66	1,495571429	83,2
32					1,406760563	86,52

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los ovocitos inmaduros y madurados *in vitro* y entre las distintas horas de maduración (72 y 96 h), no así en el tamaño total de los ovocitos de cada grupo.