



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

RELACIÓN ENTRE LA MORFOMETRÍA Y CAPACIDAD
DE FERTILIZACIÓN DE LOS OVOCITOS DE RATÓN DE
LA CEPA CD-1

Tesis que para obtener el título de:

LICENCIADA EN BIÓLOGIA

PRESENTA:

Dulce Elisette Ramiro Alvarado

DIRECTORA: Dra. Rosalina María De Lourdes Reyes
Luna



Agosto 2016

Agradecimientos

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y a todos mis profesores por contribuir en mi formación y ampliar mis horizontes.

Al laboratorio de biología de la reproducción por la ayuda que me brindaron.

A la doctora Rosalina por haberme aceptado, por la paciencia que me tuvo y el apoyo que me brindo durante la elaboración de esta tesis.

A mi familia por toda la ayuda que me brindaron a lo largo de mis años de de estudio.

A mis amigos por todos los momentos divertidos que pase en su compañía.

Gracias

Dedicatoria

A mi madre por enseñarme que todo lo que se empieza debe de concluirse

A mi padre porque me enseñó que los sueños deben de perseguirse.

Mi querida hermana por todos esos momentos de interrupción cuando necesitaba ayuda

A mi hermano por los momentos divertidos y hacerme reír.

Por ustedes este sueño concluye y empieza otro....

Gracias

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| Índice general..... | 3 |
| Índice de figuras..... | 4 |
| Índice de tablas..... | 5 |
| Índice de graficas..... | 5 |
| Resumen..... | 6 |
| INTRODUCCIÓN..... | 8 |
| Técnicas de Reproducción Asistida (TRA)..... | 22 |
| ANTECEDENTES..... | 24 |
| Maduración nuclear y citoplasmática..... | 24 |
| Morfología de ovocitos y fertilización..... | 26 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 28 |
| HIPÓTESIS..... | 28 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 29 |
| OBJETIVOS PARTICULARES..... | 29 |
| MATERIAL Y MÉTODOS..... | 30 |
| Animales..... | 30 |
| Obtención de ovocitos..... | 30 |
| Obtención de espermatozoides..... | 31 |
| Fertilización <i>In Vitro</i> (FIV)..... | 31 |
| Determinación morfométrica..... | 31 |
| RESULTADOS..... | 35 |
| DISCUSIÓN..... | 43 |

| | |
|-------------------|----|
| CONCLUSIÓN..... | 45 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 46 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Migración de las células germinales..... | 9 |
| Figura 2. Fases de la ovogénesis..... | 10 |
| Figura 3. Meiosis en ovocitos..... | 12 |
| Figura 4. Ciclo menstrual y hormonas..... | 13 |
| Figura 5. Control hormonal en reproducción femenina..... | 15 |
| Figura 6. Estructura de un ovocito..... | 16 |
| Figura 7. Fases de la fecundación..... | 18 |
| Figura 8. Obstaculización de la poliespermia..... | 19 |
| Figura 9. Pronúcleos masculino y femenino..... | 20 |
| Figura 10. División de un ovocito..... | 21 |
| Figura 11. Fertilización <i>in vitro</i> | 23 |
| Figura 12. Medición de la zona pelúcida..... | 32 |
| Figura 13. Medición del ovocito..... | 33 |
| Figura 14. Medida de la circunferencia del ovocito..... | 34 |
| Figura 15. Medidas promedio de un ovocito maduro..... | 35 |
| Figura 16. Ovocitos fecundados hasta etapa de dos células..... | 42 |
| Figura 17. Ovocitos fecundados hasta mórula..... | 43 |

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Técnicas de reproducción asistida..... 22

Tabla 2. Porcentaje de ovocitos fecundados..... 35

ÍNDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1. Rangos de ovocitos encontrados 36

Gráfica 2. Porcentaje de ovocitos fecundados..... 37

Gráfica 3. Rangos de la zona pelúcida..... 38

Gráfica 4. Relación de FIV y zona pelúcida..... 39

Gráfica 5. Rangos del diámetro total del ovocito..... 40

Gráfica 6. Porcentaje de fertilización del diámetro total..... 41

Resumen

La infertilidad es un problema que afecta a aproximadamente 1.5 millones de parejas en México, esto según datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática.

La infertilidad se define como la incapacidad de lograr un embarazo a pesar de que las parejas hayan mantenido relaciones sexuales durante un periodo mayor a 12 meses sin protección. Existen dos tipos de infertilidad. La infertilidad primaria se refiere a las parejas que nunca han quedado embarazados después de mantener relaciones sexuales al menos un año sin usar métodos anticonceptivos. La infertilidad secundaria es cuando las parejas ya han tenido hijos al menos una vez y no lo han logrado nuevamente.

La edad en que una mujer alcanza el pico de fertilidad es de los 20 a los 25 años, conforme la edad avanza las probabilidades del embarazo disminuyen especialmente después de los 40. Debido a esto es que se han creado diversas técnicas de reproducción asistida (TRA), cuya función es ayudar a las parejas que no pueden tener hijos y en especial en casos donde la mujer es mayor a 35 años. Estas técnicas no siempre dan buenos resultados debido a una inadecuada selección de los ovocitos, como puede ser la selección de ovocitos sin maduración citoplasmática y nuclear, esto desembocaría en anomalías morfológicas, por lo tanto, es necesario que el ovocito se encuentre maduro tanto nuclear y citoplasmáticamente. La maduración nuclear del ovocito, comprende el paso de la etapa de primer cuerpo polar al segundo arresto meiótica e implica transformaciones cromosómicas importantes. La maduración citoplasmática involucra cambios morfológicos y funcionales, cambios en la expresión de proteínas celulares y modificaciones transcripcionales del ARNm. Estos cambios dan como resultado un ovocito rodeado por una matriz de glicoproteínas denominada Zona Pelúcida (ZP), un citoplasma con su propia membrana celular, un espacio previtelino que se encuentra entre la membrana celular del citoplasma y la ZP, este espacio previtelino contiene el cuerpo polar del ovocito en MII. A

cada una de estas estructuras se le pueden determinar sus dimensiones y podrían identificar a un ovocito maduro.

El objetivo del presente trabajo fue determinar las dimensiones morfológicas de ovocitos ovulados de ratón que nos indiquen si se encuentran maduros nuclear y citoplasmáticamente al ser fertilizados *in vitro*. Se determinó que existe una relación entre el éxito de la fertilización *in vitro* y las dimensiones de los óvulos. Ovocitos con diámetro citoplasmático entre 80 y 90 μm , con un grosor de la zona pelúcida entre 8 y 9 μm y un diámetro total (ZP + ovocito) entre 90 y 100 μm presentaron un mayor porcentaje de fecundación (70, 73 y 62 respectivamente). Estos ovocitos pueden ser elegidos para los procesos de Reproducción Asistida. Sin embargo esto no asegurará una eficacia del 100% en la fertilización.

Introducción

Una característica de los seres vivos es la reproducción, éste es un proceso biológico que va a permitir la creación de nuevos organismos y la permanencia de una especie. La reproducción puede englobarse en dos grandes grupos: la asexual y la sexual. La asexual da origen a nuevos individuos a partir de la división de células somáticas, lo que genera individuos con la misma información genética (Jiménez y Ruiz, 2006). La reproducción sexual se lleva a cabo en organismos que presentan gónadas mediante la unión de células especializadas, un óvulo y un espermatozoide, generadas previamente por meiosis, gracias a esto existe una recombinación de genes, de los que el nuevo organismo obtendrá características tanto de la madre como del padre, lo cual asegurará una variabilidad genética.

Tanto los espermatozoides como los óvulos son el resultado de un proceso llamado gametogénesis, en el que las células maduran y adquieren su capacidad para la fecundación (Sadler, 2000).

La ovogénesis es el proceso mediante el cual ovogonias se transforman en ovocitos maduros y listos para la fecundación (Knobil y Neill, 2006).

La gametogénesis consta de cuatro fases:

Fase I.- Origen extraembrionario de células germinales y migración a las gónadas en formación (Figura 1).

Las células germinales primordiales (CGP) migran hacia las gónadas debido a que se originan fuera de ellas (Figura 1), esto ocurre durante los primeros estadios del desarrollo embrionario. (Chuaire et al., 2002; Soto-Suazo et al., 2005). Se cree que las crestas genitales producen una sustancia que atrae a las células germinales, llamada telóferon (Cabero et al., 2007).

En esta fase la gametogénesis es idéntica en el hombre y la mujer.

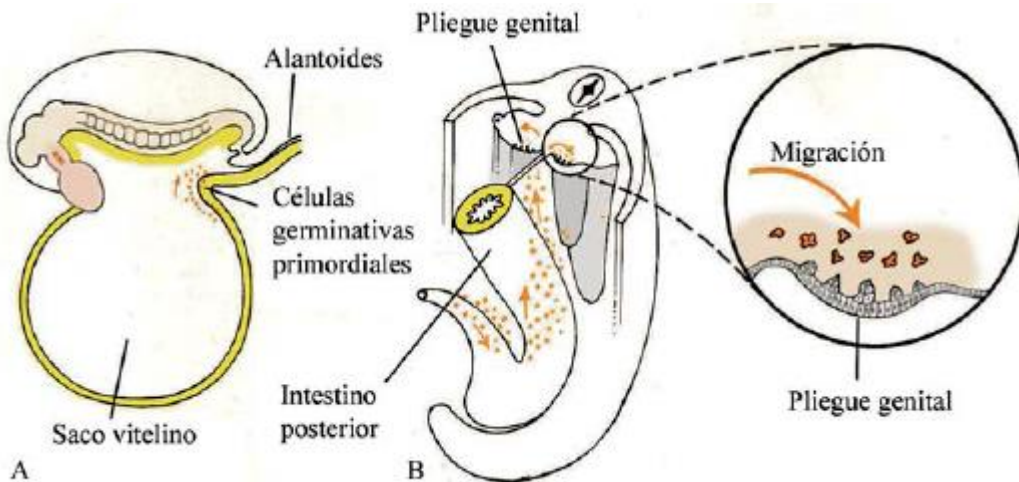


Figura 1. Diagrama que muestra, la migración de las células germinales primordiales desde la pared del saco vitelino a las crestas genitales pasando por el mesenterio dorsal del intestino posterior. La migración ocurre a finales de la tercera o inicios de la cuarta semana del desarrollo.

Fase II.- Aumento del número de células germinales mediante mitosis (Figura 2).

Las CGP comienzan a dividirse mitóticamente para incrementar su número, resultando células diploides genéticamente iguales (Vantman et al., 2010).

Las ovogonias se dividen únicamente en el periodo prenatal (Figura 2), esto significa que en las células femeninas habrá un número limitado de células germinales.

Hacia el final del tercer mes, las ovogonias se agrupan y serán envueltas por una capa de células epiteliales, denominadas células foliculares, dando lugar a los folículos primordiales.

Algunos óvulos van a degenerarse de forma natural, este proceso recibe el nombre de atresia.

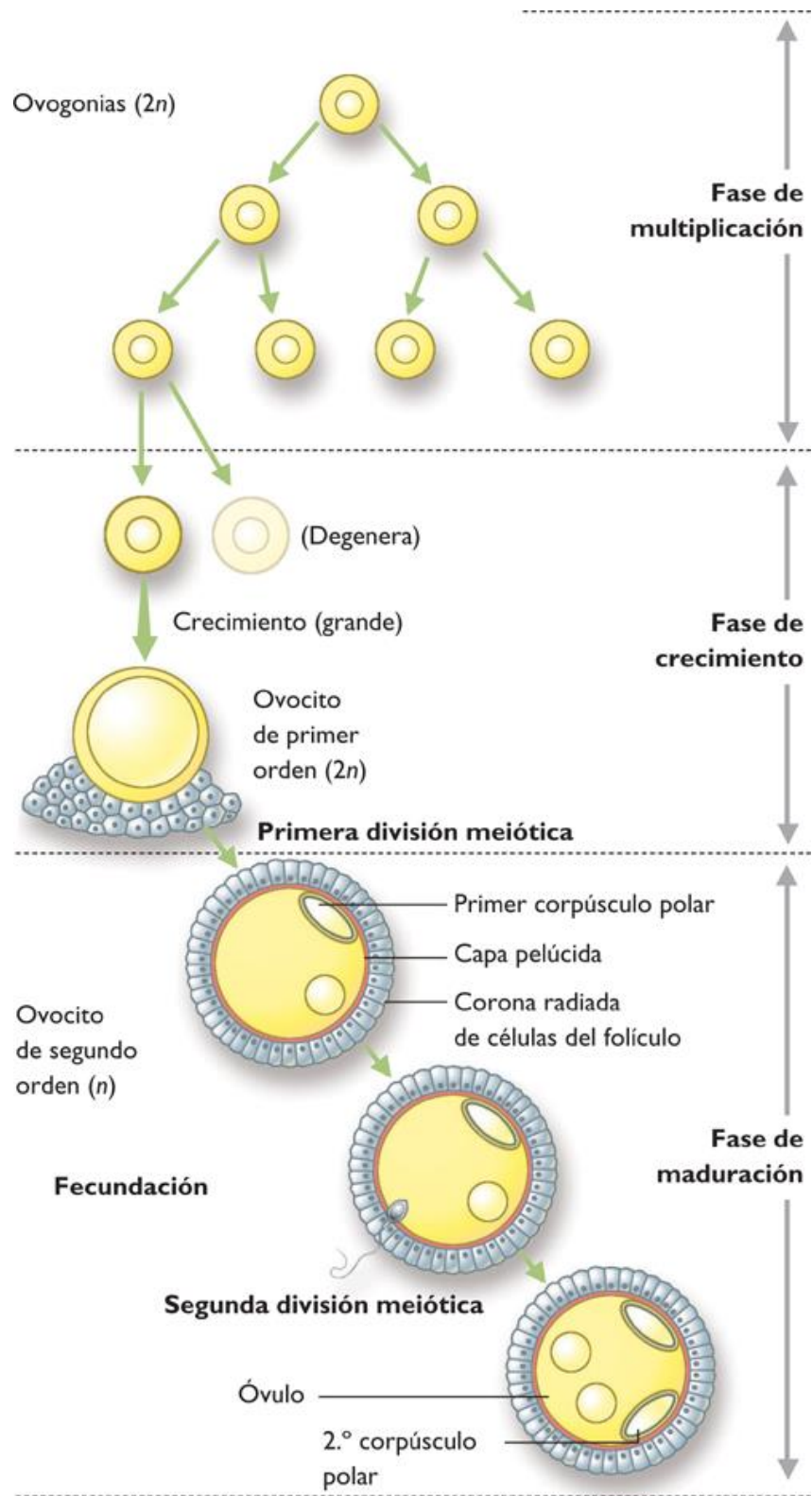


Figura 2: Esquema que representa las tres primeras fases de la ovogénesis en mamíferos.

Fase III.- Reducción de número de cromosomas mediante meiosis.

En esta fase las células germinales reducen su carga cromosómica de $2n$ (diploide) a $1n$ (haploide) (Figura 2).

Los ovocitos primarios sobrevivientes a la atresia entran en la primera división meiótica o división reduccional.

La división reduccional sucede cuando las células hijas reducen su carga cromosómica a $1n$ pero las cromátidas hermanas siguen unidas por el centrómero y la carga es $2c$ (cromátidas) (Figura 3).

Esta división meiótica va a interrumpirse al nacimiento, en la que los óvulos quedan suspendidos en fase de diplotenia, esto se debe a la acción del inhibidor de maduración del ovocito (IMO) secretado por las células foliculares.

La meiosis II o división ecuatorial retomará su curso cuando el individuo llegue a la pubertad, en esta etapa de la meiosis los centrómeros que están unidos por las cromátidas hermanas se dividen, dando como resultado una célula completamente haploide ($1n\ 1c$) (Figura 3).

Habrà otra detención en la maduración de los óvulos, y esta se dará en metafase 2, cuando el ovocito presente el primer cuerpo polar y sea ovulado. Para que el ovocito siga con su maduración nuclear es necesario que un espermatozoide fecunde el óvulo.

De esta forma los ovocitos continuarán su maduración de forma cíclica (ciclo menstrual), por la acción de hormonas, mientras exista vida fértil en la mujer (Figura 4).

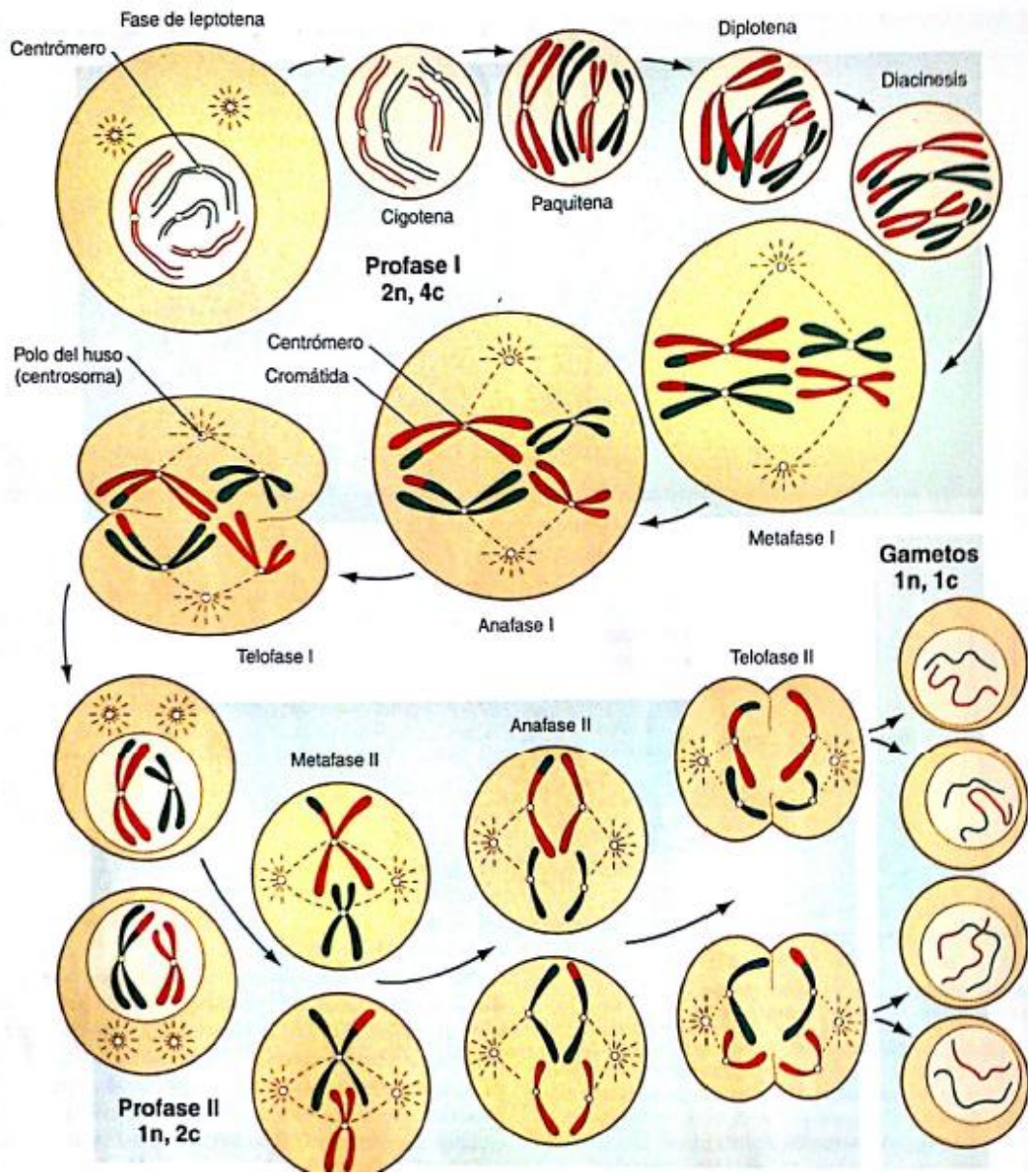


Figura 3.- Diagrama que muestra las dos fases de la meiosis y los bloqueos durante la maduración nuclear del ovocito en mamíferos.

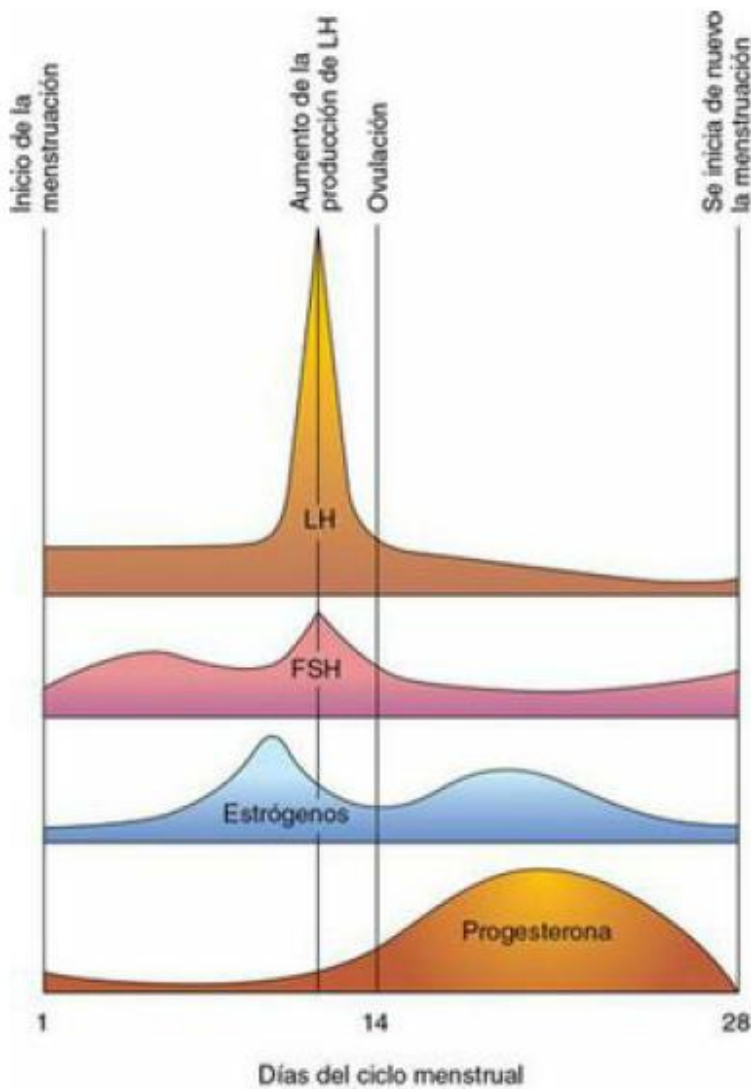


Figura 4.- Diagrama que muestra las hormonas que intervienen en el ciclo menstrual, puede verse que pocos días antes de la ovulación hay un alza en la hormona luteinizante y la folículo estimulante, y pasada la ovulación hay un aumento de progesterona y estrógenos.

Fase IV.- Maduración estructural y funcional de los óvulos y los espermatozoides.

Para que las células germinales estén listas para la fecundación deben de pasar por una fase de maduración, durante la cual no se observan cambios significativos en los ovocitos.

Las células de la granulosa o células foliculares, son células de soporte que rodean al ovocito. Antes de que el ovocito madure, estas células tienen varias funciones como el intercambio de aminoácidos y metabolitos que servirán para el crecimiento del ovocito. También se encargan del primer bloqueo, debido a que secretan un factor inhibidor de la meiosis, además éstas intervienen con la

maduración de los ovocitos, ya que liberan progesterona y presentan receptores para la hormona luteinizante (Barcat., 2009)

La maduración del ovocito está regulada por el cerebro. El hipotálamo secreta la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) que estimula a la hipófisis y secreta hormonas gonadotrópicas como la hormona luteinizante (LH) y foliculoestimulante (FSH) (Figura 5). Ésta última estimula el crecimiento de varios folículos primordiales, sin embargo solo uno de los folículos primarios madurará y será liberado (Figura 6) (Moore, Persaud y Torchia, 2008).

La LH y la FSH inducen los cambios cíclicos en el ovario, al comienzo de la pubertad y su producción decrece cuando se llega a la menopausia, también estimulan al ovario a producir estrógeno y progesterona, (principalmente tienen un efecto en el desarrollo del aparato reproductor femenino), si el factor inhibidor hipotalámico está ausente, la hipófisis también producirá la prolactina, esta hormona actúa sobre las glándulas mamarias estimulando la producción de leche (Tresguerres et al 2009).

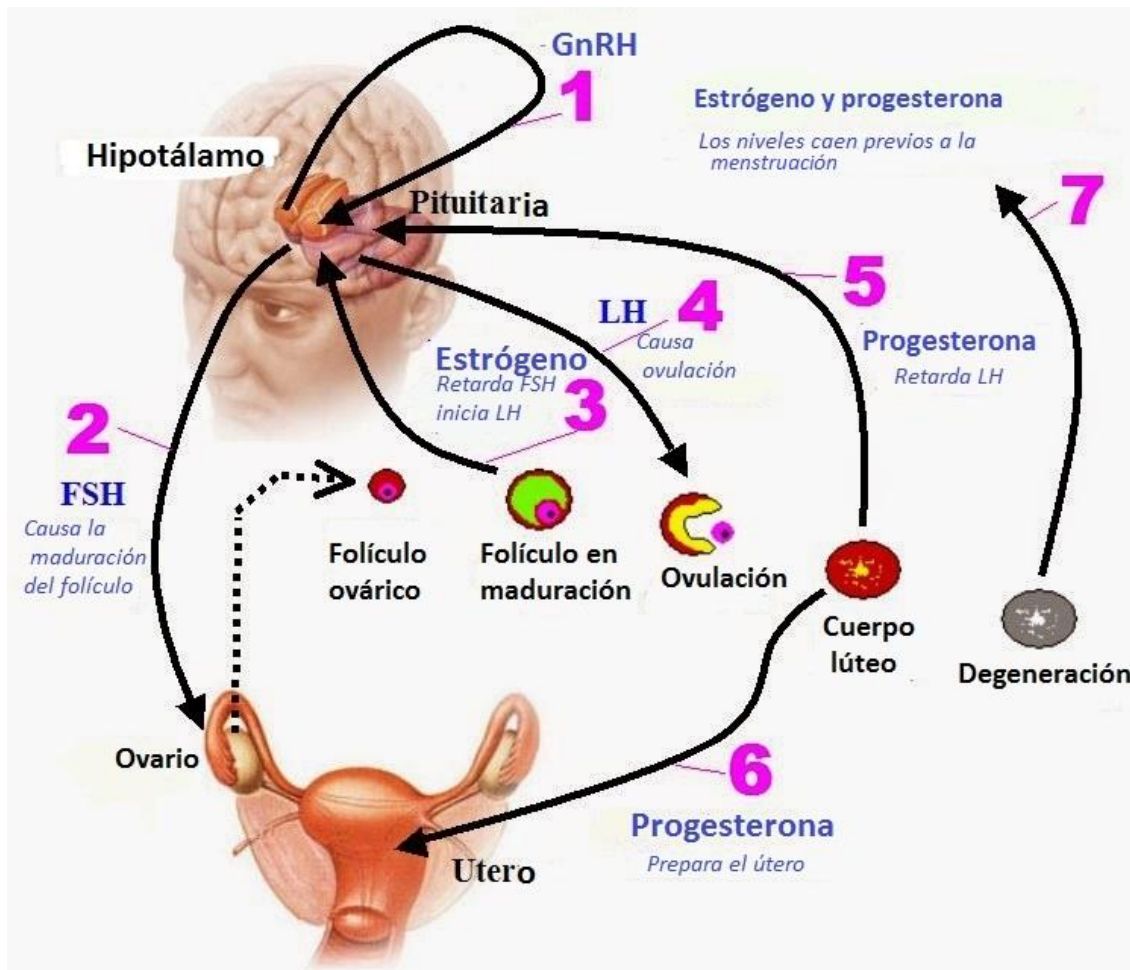


Figura 5. Diagrama que muestra las diferentes hormonas que intervienen en el control de la reproducción femenina y las funciones que tiene cada una. Como puede verse las hormonas trabajan en conjunto con la finalidad de preparar al cuerpo femenino para la implantación de un ovocito fecundado y de esta forma desarrollar a un nuevo individuo.

El ovocito será expulsado del ovario pasando por las trompas de Falopio, donde las células de granulosa se separan del ovocito, y por medio de contracciones musculares será impulsado hacia el útero (Figura 5). Algunas células de granulosa rodearán la zona pelúcida del óvulo, formando la corona radiada (Figura 6). Si el ovocito llega al útero y no ha sido fecundado se degenera y el cuerpo lúteo se deteriora hasta desaparecer, provocando el sangrado menstrual debido a la disminución de la producción de hormonas, en caso contrario si la fecundación se lleva a cabo, el cuerpo lúteo crece, provocando un aumento en la producción de

hormonas, como la gonadotropina coriónica humana (hCG), esta hormona evitará la degeneración del cuerpo lúteo.

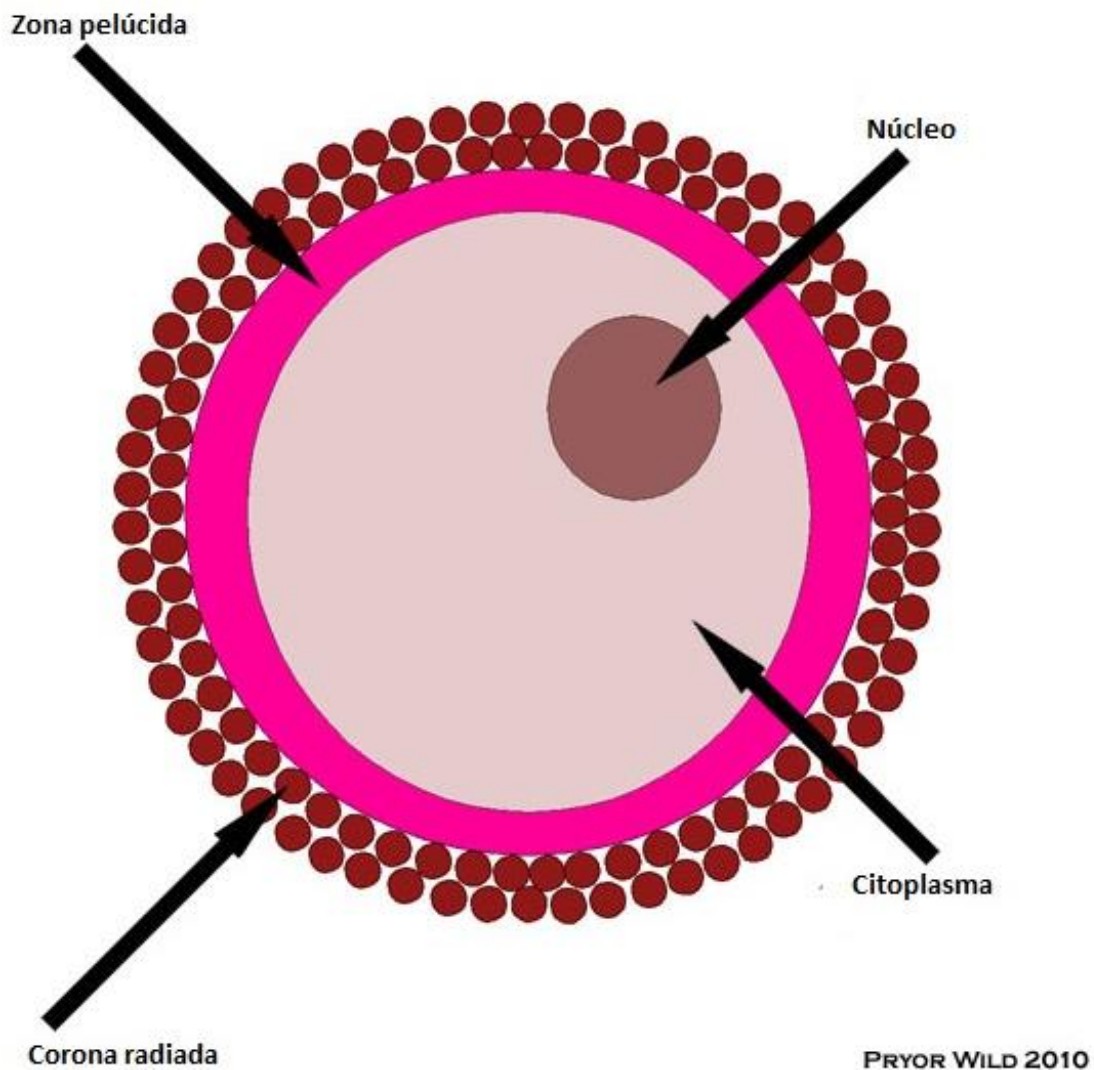


Figura 6. Diagrama que muestra la estructura del ovocito de mamíferos: núcleo, citoplasma, zona pelúcida que está ubicada entre el ovocito y la corona radiada, esta última está formada por dos o tres capas de células foliculares.

Para que haya una adecuada fertilización es necesario que el óvulo se encuentre maduro citoplasmáticamente (Quetzal Vidal, 2014; Valdes *et al.*, 2010; E.M., 2006).

La fecundación se da en la región ampollar de las trompas de Falopio, que es la parte más ancha. Da inicio a una serie de cambios fisiológicos, hormonales y

físicos, estos comienzan cuando el espermatozoide penetra en el ovulo y finalizan cuando la información genética se recombina. El resultado es un individuo con características genotípicas y fenotípicas de ambos padres.

La fecundación se divide en tres fases (Figura 7) que son:

Fase I.- Penetración del espermatozoide a la corona radiada del ovocito.

La corona radiada está formada por una matriz extra celular de proteínas y carbohidratos especialmente ácido hialurónico (AH). Se cree que la Hialuronidasa contenida en la cabeza espermática ayuda a la penetración de la corona radiada, además del movimiento espermático. (Carlson y Kantaputra, 2014)

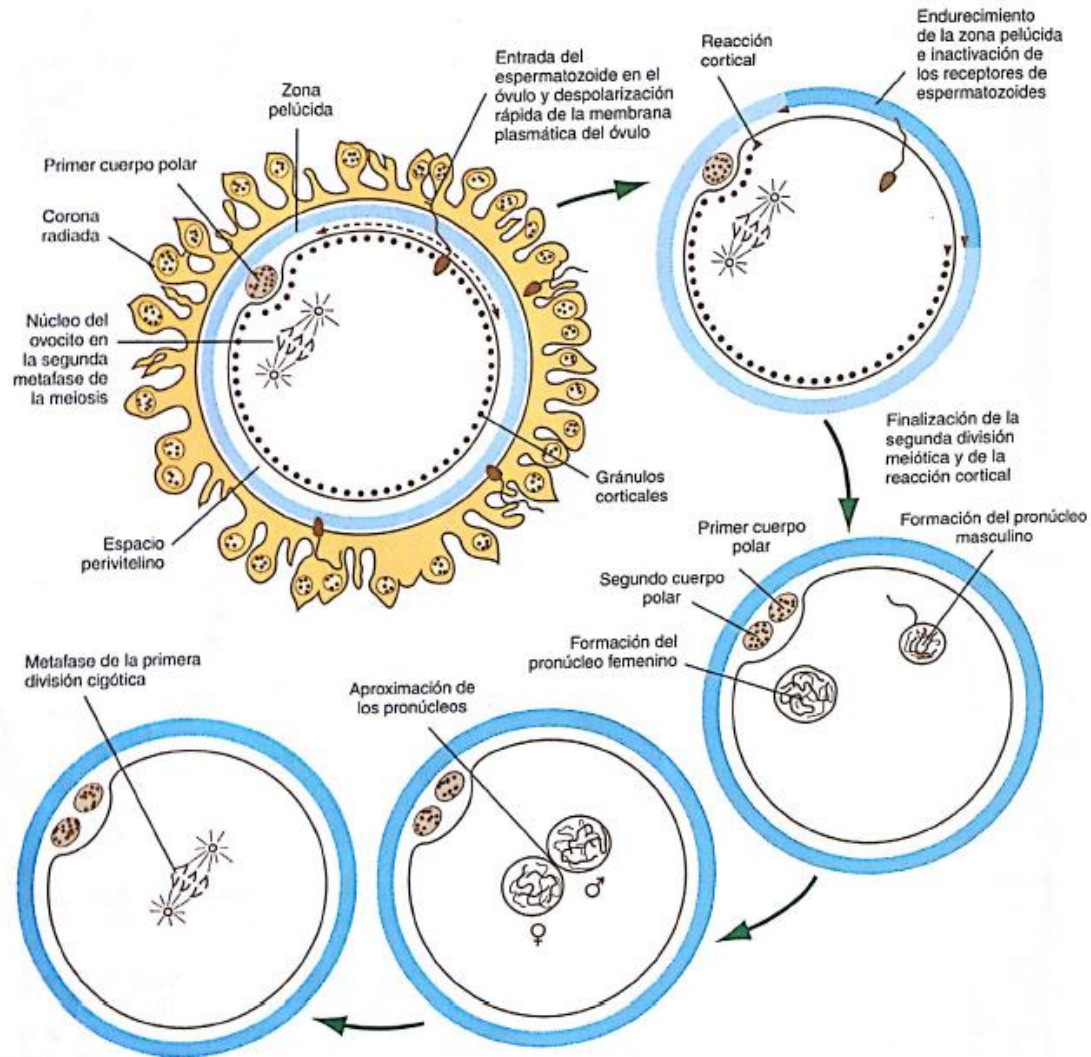


Figura 7.- Diagrama que muestra las principales fases de la fecundación, la cual inicia cuando un espermatozoide atraviesa la corona radiada (fase I) y la zona pelúcida (fase II), después se lleva a cabo la reacción cortical para que un segundo espermatozoide no entre en el ovocito, se libera el segundo cuerpo polar y los pronúcleos masculino y femenino entran en metafase para combinar su material genético (fase III).

Fase II.- Penetración del espermatozoide a la zona pelúcida.

La zona pelúcida está compuesta por cuatro glicoproteínas: ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 (Izquierdo, 2009).

La **ZP3** es la más importante, porque ayuda a la penetración del espermatozoide a la zona pelúcida. Actúa como un receptor específico para los espermatozoides.

Los espermatozoides reconocerán la **ZP3** debido a algunas moléculas que actúan como sitios de unión exclusivos para **ZP3** (Valdés et al. 2010).

Hay enzimas que provocan la lisis de la zona pelúcida, como las esterasas, acrosina y neuraminidasa. La acrosina es de vital importancia, debido a que induce la proteólisis de la zona pelúcida (Valdés et al. 2010).

Después de que el espermatozoide tiene contacto con la superficie del ovocito la zona pelúcida tiene un cambio en sus propiedades, que evita una poliespermia (figura 8).

El cambio en la zona pelúcida se debe a la liberación de enzimas lisosómicas de los gránulos corticales, esto provoca que la membrana del ovocito se vuelva impenetrable para otros espermatozoides, inactivando la **ZP3** (Valdés et al. 2010).

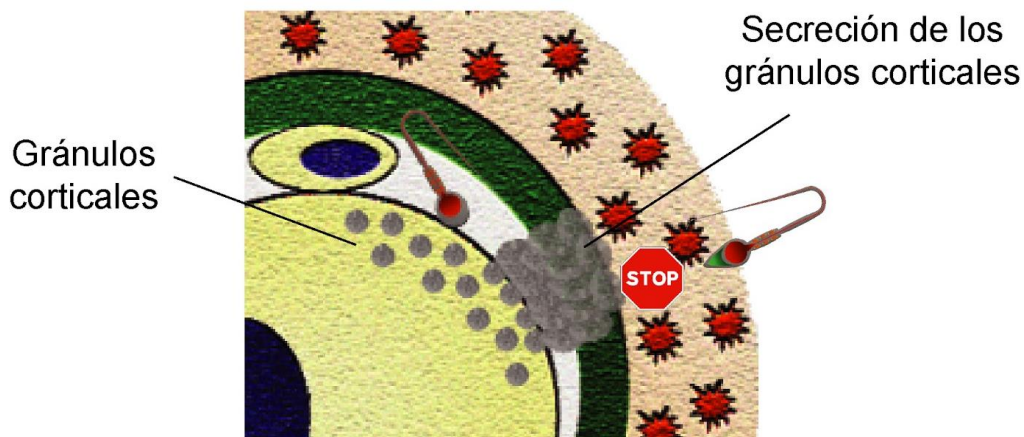


Figura 8.- La imagen muestra cómo los gránulos corticales secretan su contenido y modifican la estructura de la zona pelúcida impidiendo la entrada de un segundo espermatozoide al ovulo una vez que este ya ha sido fecundado.

Fase III.-Fusión de las membranas celulares, del ovocito y el espermatozoide.

Una vez que el espermatozoide ha atravesado la zona pelúcida, las moléculas de la membrana del esperma (fertilina y cirtestina) se unen a las moléculas de la membrana del óvulo (integrina $\alpha 6 - \beta 1$), sí las moléculas de ambos gametos no se

reconocen, las membranas del espermatozoide y del óvulo no se fusionan (Valdés et al. 2010).

Cuando el espermatozoide entra en contacto con el ovulo, el óvulo termina con la segunda división meiótica, y se forma el segundo cuerpo polar (fase III).

Los pronúcleos femenino y masculino cuentan con envolturas nucleares (figura 9), que se pierden cuando entran en contacto entre ellos y los cromosomas de ambos pronúcleos se mezclan, de esta forma comienza una mitosis normal (Matorras et al, 2008).

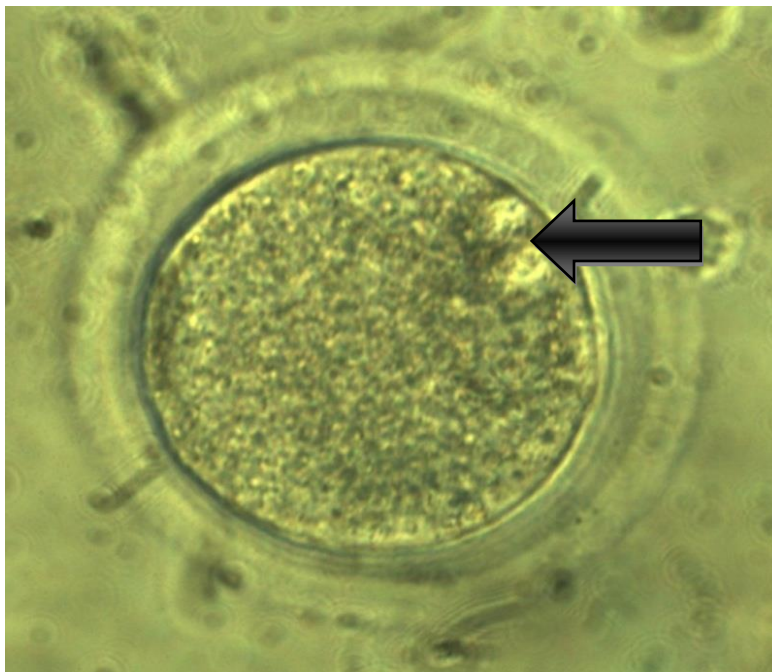


Figura 9.- Microfotografía en contraste de fases que muestra un óvulo fecundado y la presencia de dos pronúcleos, masculino y femenino, bien definidos con sus envolturas nucleares (Flecha).

Como resultado tendremos una célula con 23 pares de cromosomas, entre ellos un cromosoma X o Y que determinará el sexo del cigoto y el inicio de la segmentación.

En el cigoto se llevarán a cabo una serie de divisiones hasta que este se implante en el endometrio donde seguirá con su desarrollo (Figura 10).

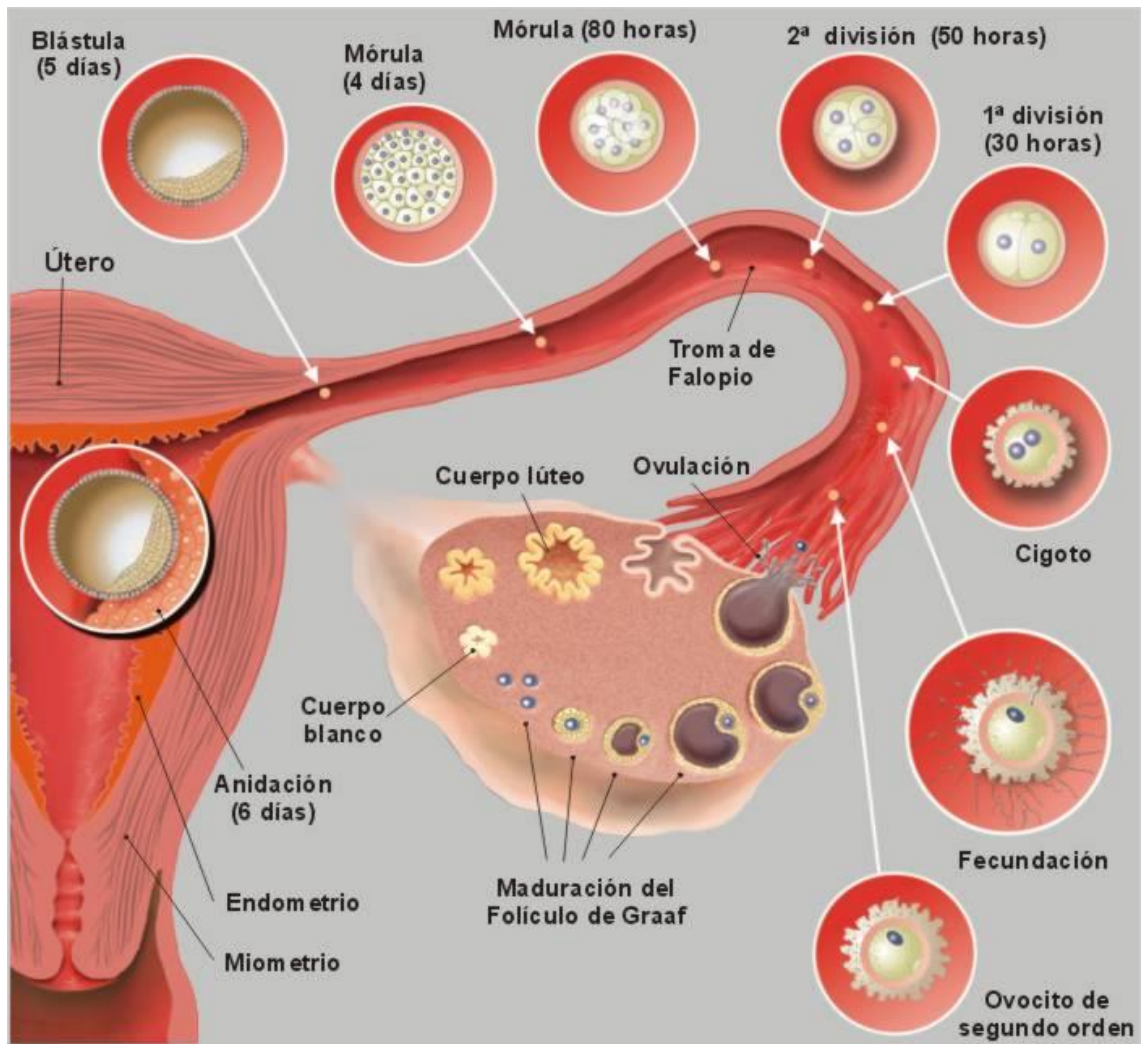


Figura 10.- Imagen que muestra las divisiones que hay en el ovocito fecundado en humano y la anidación del embrión en el útero.

Técnicas de Reproducción Asistida (TRA).

Según la OMS la infertilidad es una enfermedad que afecta la capacidad de lograr un embarazo clínico, debido a esto se han creado técnicas destinadas a ayudar al proceso de la fertilización.

La reproducción asistida consiste en una serie de técnicas que ayudan a que exista fecundación de forma artificial, dentro de ellas están: inseminación intrauterina (IIU), transferencia de gametos en la trompa de Falopio (GIFT), transferencia de embriones en la trompa de Falopio (ZIFT), inyección intracitoplasmática de espermatozoides a óvulos (ICSI) y fertilización *in vitro* (FIV) (Figura 11) (Tabla 1) (Versión en inglés revisada por: Susan Storck, 2016).

| IIU | GIFT | ZIFT | ICSI | FIV |
|--|---|--|--|--|
| Técnica sencilla en la que los espermatozoides capacitados se depositan en el útero por medio de una cánula. | Los óvulos son aspirados del ovario de la paciente y se colocan con los espermatozoides en las trompas de Falopio | Cuando los embriones están en etapa de blastocito se transfieren al útero del paciente | Los espermatozoides serán inyectados en los óvulos aspirados | Unión de un ovulo con un espermatozoide fuera del cuerpo de la paciente, los óvulos deben ser incubados en la presencia de espermatozoides capacitados para que se forme un embrión en cultivo y posteriormente sea transferido al útero |

Tabla 1.- Muestra las diferentes técnicas de reproducción asistida.

Para llevar a cabo la FIV en el humano son necesarios los siguientes pasos:

- **Inducción de la superovulación.-** Mediante la administración de fármacos se incrementa la producción de óvulos.

- **Recuperación de óvulos en el ovario.**- Se introduce una aguja delgada a través de la vagina hasta el folículo ovárico desarrollado donde se extraen los óvulos por medio de aspiración.
- **Inseminación y fecundación.**- Los espermatozoides se colocan junto con los óvulos, posteriormente se incuban en condiciones controladas de temperatura y CO₂.
- **Cultivo del embrión.**- A partir de que el óvulo se divide deben esperarse 5 días para que se transfiera al útero.

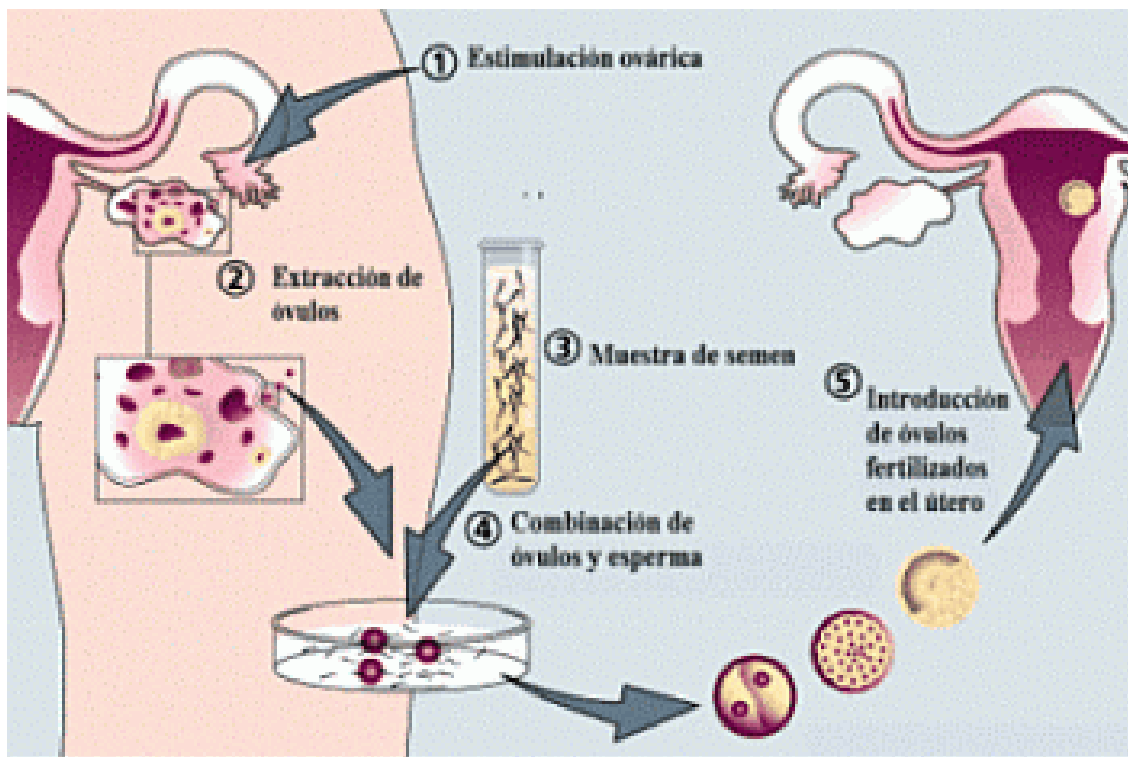


Figura 11.- Diagrama que muestra el proceso para la FIV. Para que exista una superovulación se administran fármacos que eleven las concentraciones de hormonas que provocarán un incremento en la producción de óvulos, la hormona foliculoestimulante (FSH) y la luteinizante (LH) son las encargadas de dicho incremento.

Cuando se quiere aumentar la producción de óvulos artificialmente es necesario administrar ciertos fármacos que favorezcan esta producción, en el caso de los animales es necesaria la administración de gonadotropina coriónica humana (HCG) y gonadotropina coriónica equina (PMSG).

Antecedentes

La maduración nuclear y citoplasmática del ovocito.

Los procesos involucrados en la maduración del ovocito ocurren desde la etapa fetal de la hembra hasta el final de su vida reproductiva. Las ovogonias o células germinales primordiales sufren divisiones mitóticas prenatalmente para asegurar que la hembra nazca con suficientes células germinales que posteriormente formarán folículos. Sin embargo, solo una parte de las ovogonias reinician meiosis formando ovocitos primarios, que son con los que nacerá la hembra (Senger, 1999).

La maduración del ovocito se divide en maduración nuclear y citoplasmática, estos hacen referencia a los cambios por los cuales el ovocito debe de pasar para poder ser fecundado exitosamente por un espermatozoide y poder desarrollar el embrión (Martínez Madrid, 2002).

La maduración citoplasmática involucra cambios morfológicos y funcionales relacionados con la relocalización de organelos (Stricker *et al.*, 2006; Brevini *et al.*, 2007 De los Reyes *et al.*, 2007; Reyes *et al.*, 2011; de Lesegno *et al.*, 2007), cambios en la expresión de proteínas celulares responsables de conducir al ovocito hacia competencias fundamentales para su desarrollo (Watson, 2007) y modificaciones transcripcionales de mRNA (Ellederova, 2004).

La maduración nuclear, definida como el progreso desde el primer al segundo arresto de la división meiótica, implica transformaciones cromosómicas importantes. La desintegración de la envoltura nuclear (GVBD) marca el inicio de la maduración, la cual progresa hasta la primera metafase (MI), seguida por la extrusión del primer cuerpo polar y el avance hasta la segunda metafase (MII) (Richard, 2007).

La maduración nuclear de los ovocitos de mamíferos continuará en el momento de la fertilización después de que ha sido ovulado.

En la mayoría de las hembras de mamíferos la maduración nuclear y citoplasmática ocurre bajo el ambiente folicular, esto quiere decir que ocurre antes de que el ovocito sea ovulado (Eppig *et al.*, 2001). Sin embargo un estudio que se realizó en perros indicó que en los cánidos, los ovocitos son ovulados en la profase de la primera división meiótica (Renton *et al.*, 1991; Songsasen y Wildt 2007), esta etapa es identificada morfológicamente como etapa de vesícula germinal (GV).

La maduración *in vitro* (MIV) es el principal factor que limita la producción eficiente de embriones, esto ocasiona que algunas veces las técnicas de reproducción asistida no sean exitosas, probablemente se deba a la incapacidad del medio de cultivo para producir las señales de comunicación adecuadas entre los ovocitos y las células somáticas cercanas (Eppig *et al.* 1996)

El complejo corona- cúmulo- ovocito (CCCO) no es un indicativo de si el ovocito se encuentra maduro nuclearmente, si será fecundado o si presenta la capacidad de desarrollarse, aunque algunos autores apoyan la idea de que sí existe una relación entre CCCO, la buena fecundación y la calidad embrionaria (Ng *et al.*, 1999; Balaban y Urman, 2006).

Para observar la maduración de los ovocitos en las TRAs, se realizó un estudio de fertilización *in vitro* de porcinos, en la cual la maduración nuclear se llevó a cabo sin dificultad, sin embargo hubieron complicaciones como: el bajo porcentaje de formación del pronúcleo masculino y una alta incidencia poliespérmica después de la fecundación *in vitro* (Day *et al.*, 2000; Niwa, 1993; Funahashi y Day, 1997). La baja formación de pronúcleo masculino se ha atribuido a una inadecuada maduración citoplasmática del ovocito en cultivo (Niwa, 1993; Nagai, 1994; Mattioli *et al.*, 1988).

Para poder determinar la MIV se realizó un estudio con diferentes medios de cultivo comerciales en ovinos y después se realizó la fertilización *in vitro*, los medios presentaron varios inconvenientes como: una gestación prolongada y

mayor peso de los ovinos al nacer, además de tener una alta incidencia en la contaminación con agentes patógenos o toxinas (Thompson et al. 2000).

Otro factor que puede estar interfiriendo en la adecuada fertilización y desarrollo de embriones puede ser el envejecimiento ovárico, este se asocia con un aumento de alteraciones cromosómicas en el ovocito que puede afectar la capacidad del embrión para la lisis de la matriz fibrilar de la zona pelúcida y la implantación (Munné *et al* 1995).

Morfología de ovocitos y fertilización.

Valdés en el 2010 dice que el ovocito humano es la célula de mayor tamaño en todo el organismo. Su diámetro varía entre 110 y 180 μm , presenta una forma esférica o ligeramente ovalada y es de color amarillento. Su núcleo es redondeado y está provisto con un nucléolo central, además cuenta con una zona pelúcida la cual, según Ebner (2003) oscila entre 12 a 15 μm en todos los mamíferos, esto contrasta con Palma (2001), el cual plantea que los diámetros están entre 15 y 20 μm .

Se ha demostrado que el grosor de la zona pelúcida varía dependiendo del desarrollo embrionario, adelgazando a partir de las primeras divisiones celulares y que el periodo de adelgazamiento puede afectar la implantación exitosa del embrión (Gabrielsen et al 2001). Edie-Osagie (2003) indican que los embriones que presentan una zona pelúcida gruesa tienen una baja probabilidad de implantación.

Se realizó un estudio en bueyes de agua y se compararon las medias de las dimensiones de los ovocitos maduros vs inmaduros, en los resultados los ovocitos maduros aumentaron su diámetro total, especialmente por el aumento de tamaño de la zona pelúcida (Quintana *et al* 2012)

Se sabe que la calidad del ovocito es indispensable para una correcta fertilización *in vitro*, por este motivo se han definido parámetros morfológicos para su clasificación. Según Veek (1986) y Lyn (2003) (Pehlivan, 2012) tenemos tres clases:

Grado 1: La corona radiada es expandida y laxa con 4 o más capas de células de granulosa.

Grado 2: La corona radiada está ligeramente compacta y presentan 2-3 capas de células cumulus.

Grado 3: Los ovocitos presentan un cumulo muy compactado; generalmente son ovocitos en estadio de vesícula germinal.

Siendo los de grado 1 los que presentan mejores características morfológicas.

Sin embargo De Santis (2007), indica que la selección de ovocitos con las mejores características morfológicas no va a asegurar el éxito de la fertilización por lo que sugiere que se busquen parámetros más viables.

Justificación

Debido a que hoy en día los problemas de infertilidad han incrementado, es necesario contar con un método que indique que óvulos son los mejores candidatos para ser fertilizados por las TRA y permitan el desarrollo de un embrión viable para su correcta implantación y la generación de un producto sano, ya que los ovocitos de ratón son muy utilizados como modelo en los procesos de fertilización de los mamíferos y en investigación en el área de Biología de la Reproducción, es importante determinar la madurez nuclear y citoplasmática de un ovocito basados en sus dimensiones y morfología, para poder ser utilizarlos con éxito en la *FIV* y otras TRA, y posteriormente poder trasladar esta metodología al humano.

Hipótesis

La selección de ovocitos, por su morfología y morfometría ayudará en el éxito de las técnicas de reproducción asistida, principalmente en la fertilización *in vitro*.

Objetivo General

Evaluar los parámetros morfológicos de ovocitos ovulados para compararlos con su capacidad de fertilización en ratones de la cepa CD-1.

Objetivos Particulares

Determinar las dimensiones del óvulo, zona pelúcida y óvulo más zona pelúcida de los ovocitos obtenidos de ratón de la cepa CD-1.

Determinar las dimensiones que identifican a los óvulos maduros, nuclear y citoplasmáticamente y que estos tengan altas probabilidades de ser fertilizados.

Materiales y métodos

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biología de la Reproducción en la Escuela de Biología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, ubicado en la ciudad de Puebla, México.

Animales

Se utilizaron 24 ratones hembra y 12 machos de la cepa CD-1 de 10 semanas de edad, los ratones se obtuvieron del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, estos se manejaron bajo la nom062zoo1999.

Se realizaron 12 experimentos donde los ratones se dividieron en grupos de dos hembras y un macho por semana.

Obtención de ovocitos.

Para la inducción de la súper-ovulación se aplicó por vía intraperitoneal 5 U.I. de gonadotropina coriónica de yegua preñada (PMSG) y 48 horas más tarde 5 U.I. de gonadotropina coriónica humana (HCG) (Fujimori et al., 2003).

Pasadas 16 horas desde la inyección de HCG, se sacrificaron a las hembras por dislocación cervical. Por medio de una pequeña incisión se extrajeron los ovarios y las asas se separaron de los cuernos uterinos y se colocaron en una caja petri de 3 cm de diámetro con medio CZB-H.

El tejido de las asas se rompió con dos agujas de insulina para la liberación de los ovocitos ovulados.

Los ovocitos se recuperaron con una micro pipeta de 5 μ L y se traspasaron a una caja petri de 3 cm de diámetro, limpia con medio CZB. Se dejaron incubando por 3 horas a 37°C en atmosfera húmeda de aire y CO₂ al 5% en una incubadora Thermo Scientific para la decumulación de las células foliculares.

Obtención de espermatozoides.

Para obtener los espermatozoides, los ratones macho se sacrificaron por dislocación cervical. Se realizó una pequeña incisión para extraer los testículos y el epidídimo y de esta manera obtener los espermatozoides.

Se localizó el epidídimo, se separaron de los testículos y lavaron con CZB-H. Con una jeringa de insulina se canalizó el conducto deferente e inyectó 1 mililitro de medio. Con la ayuda de un bisturí se realizó un corte profundo en la cola del epidídimo por la cual se recuperaron los espermatozoides en un tubo para microcentrífuga.

Los espermatozoides en el tubo se dejaron capacitar con medio CZB-H por una hora.

Fertilización *In Vitro*

Una vez que los espermatozoides fueron capacitados, se colocaron 40 óvulos repartidos en 4 gotas de medio y fueron cubiertos con aceite mineral en una caja petri de 3 cm de diámetro. A cada gota se le adicionaron 50,000 espermatozoides ($10 \mu\text{l}$). Las cajas petri se incubaron por 24 horas a 37°C en atmosfera húmeda y CO_2 al 5%. A este tiempo se revisaron para determinar el número de ovocitos que habían sido fertilizados por experimento.

Determinaciones morfométricas

A las 24 h de la fecundación se tomaron fotos de los ovocitos, con ayuda del microscopio óptico Nikon eclipse TS100 invertido en contraste de fases (10, 20 y 40x) y la cámara Scienon. Posteriormente se diferenciaron los ovocitos que se fertilizaron por la presencia de los pronúcleos femenino y masculino o división celular.

En las fotografías se determinaron las dimensiones de los embriones con el programa ISCapture. Se midió: zona pelúcida, diámetro del ovocito y diámetro total (ZP + diámetro del ovocito) y área del ovocito.

Las mediciones se realizaron de la siguiente manera:

Para el grosor la zona pelúcida se midieron 4 puntos (Figura 12), los cuales se promediaron por cada ovocito. La zona pelúcida se tomó a partir de donde finaliza el espacio pre-vitelino, hasta la cúspide de la zona pelúcida.

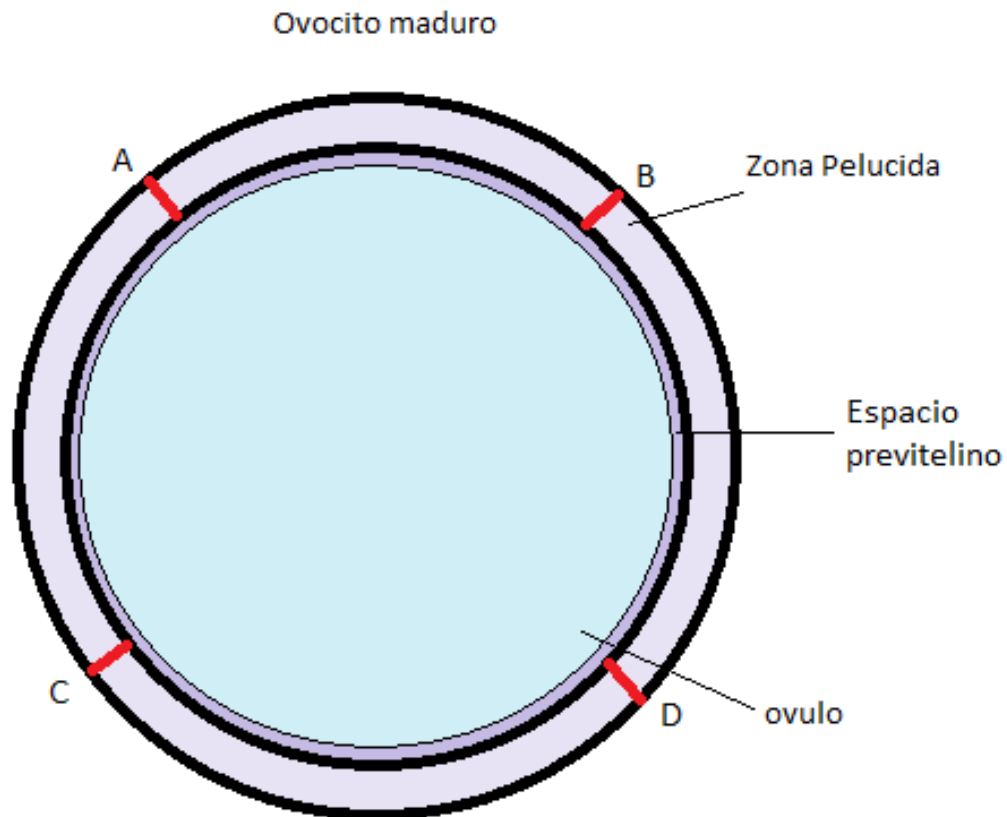


Figura 12.- El diagrama muestra los 4 puntos (A, B, C y D) donde se tomaron las mediciones para sacar el promedio de la zona pelúcida de cada ovocito.

Para las medidas del ovocito, se tomaron los extremos internos de la zona pelúcida. Se realizaron dos líneas perpendiculares y se sacó el promedio de estas de cada ovocito (Figura 13).

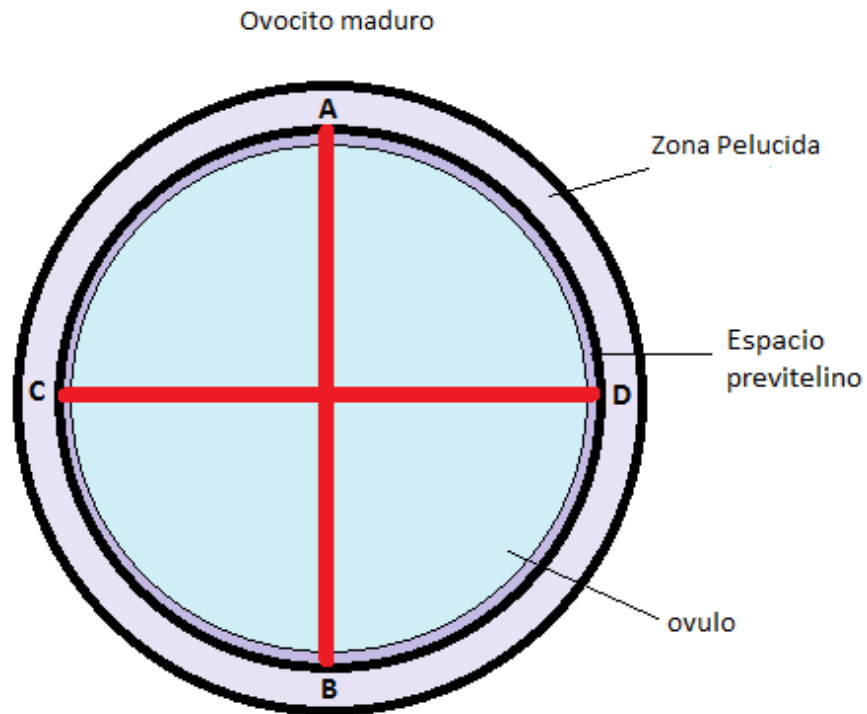


Figura 13.- Diagrama que muestra la obtención del diámetro del ovocito. Para ello se trazaron dos líneas perpendiculares, una del punto A al punto B y la otra del punto C al punto D.

Para las mediciones del diámetro total (ovocito + ZP) (Figura 14) se trazó un círculo que cubriera toda la superficie de la célula, esto con la ayuda del programa de la cámara Scienon

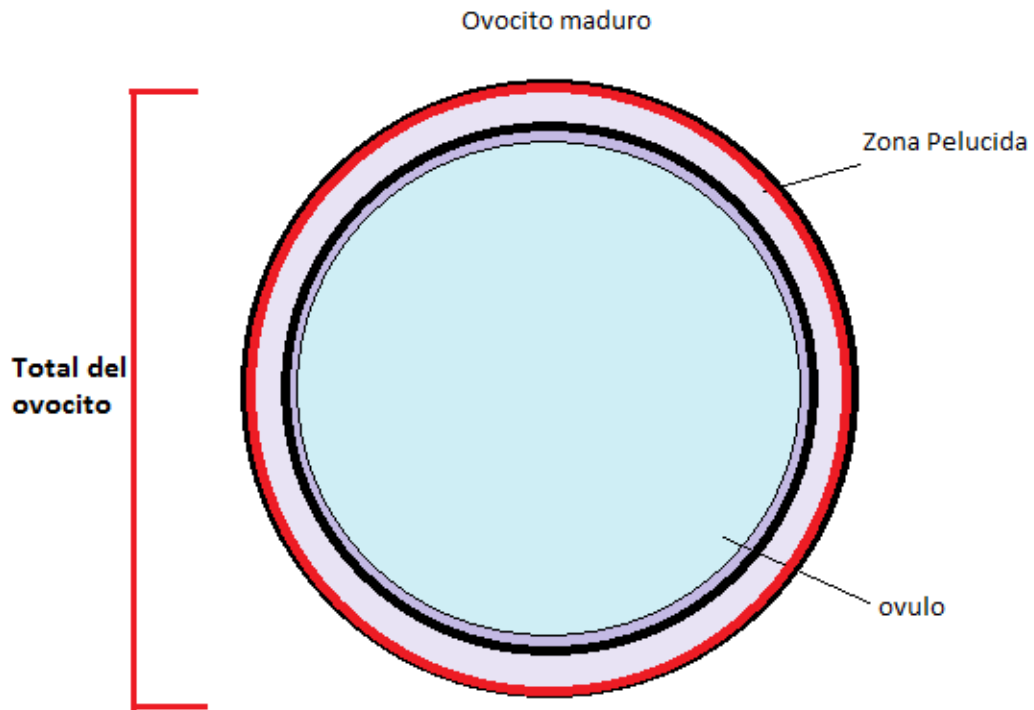


Figura 14.- La circunferencia roja se dibujó bajo el programa de la cámara Scienon para determinar el diámetro total y el área del ovocito.

Resultados

En los 12 experimentos realizados por medio de la inducción hormonal se obtuvieron 801 ovocitos ovulados de los cuales 40 fueron fecundados lo que representa el 5 %:

| Total de ovocitos obtenidos | Total de ovocitos fecundados | Porcentaje |
|-----------------------------|------------------------------|------------|
| 801 | 40 | 5% |

Tabla 2.- Se muestra el total de ovocitos obtenidos en todos los experimentos, el número de ovocitos medidos que se fertilizaron y su equivalente en porcentaje.

Los 801 ovocitos fueron sometidos a FIV y los que se fecundaron presentaron los siguientes valores promedio: grosor de la zona pelúcida 7.9 ± 1.2 ; diámetro del ovocito 78.8 ± 5.3 ; diámetro total (ZP + diámetro del ovocito) 94.8 ± 5.4 y volumen 7091.6 ± 781.8 (Figura 15).

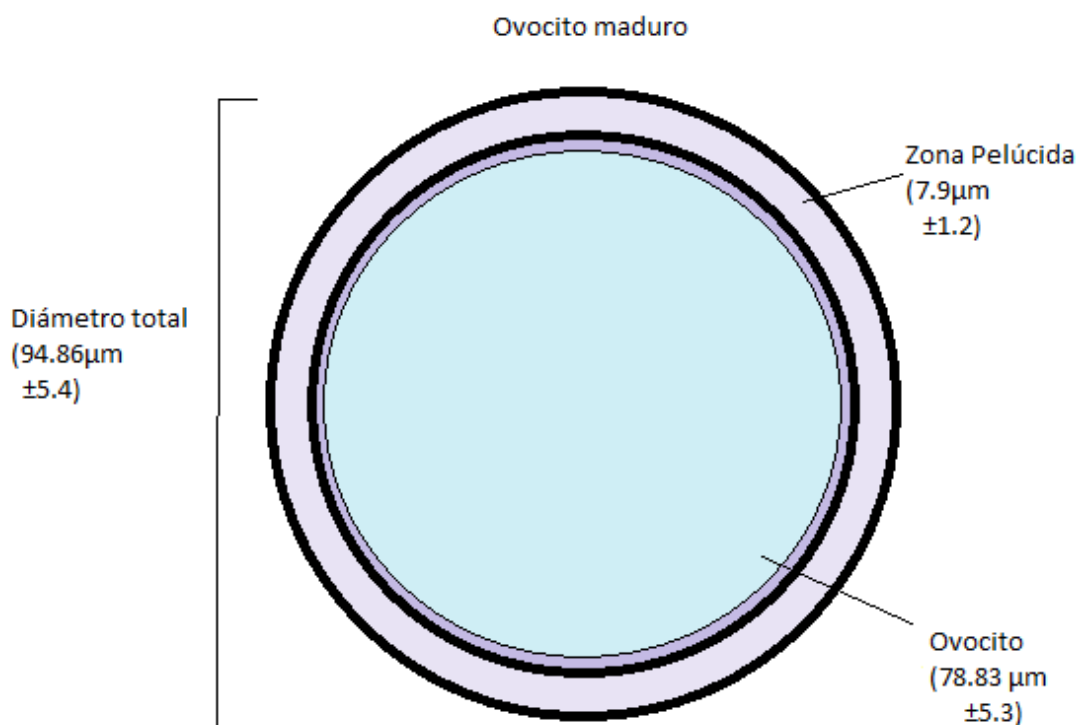
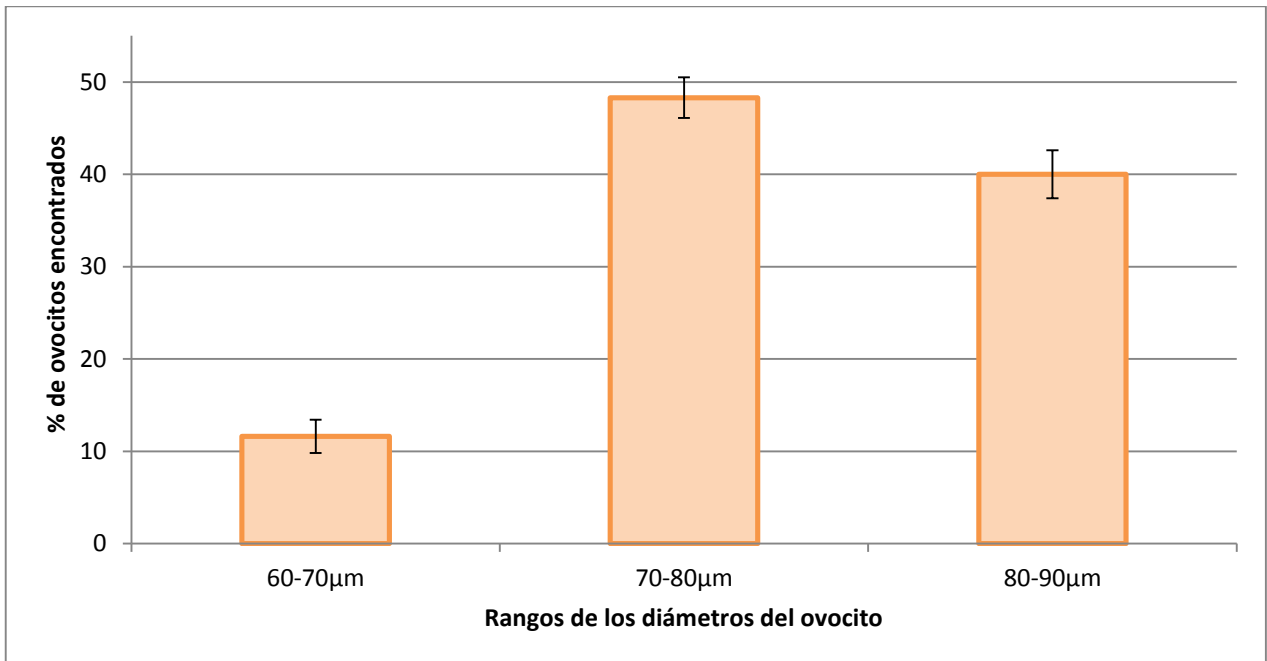


Figura 15.- Figura que muestra las medidas promedio de un óvulo maduro tanto nuclear y citoplasmáticamente, está integrado por: el diámetro total (94.86 μm), la zona pelúcida (7.9 μm) y el ovocito (78.83 μm), este ovulo es

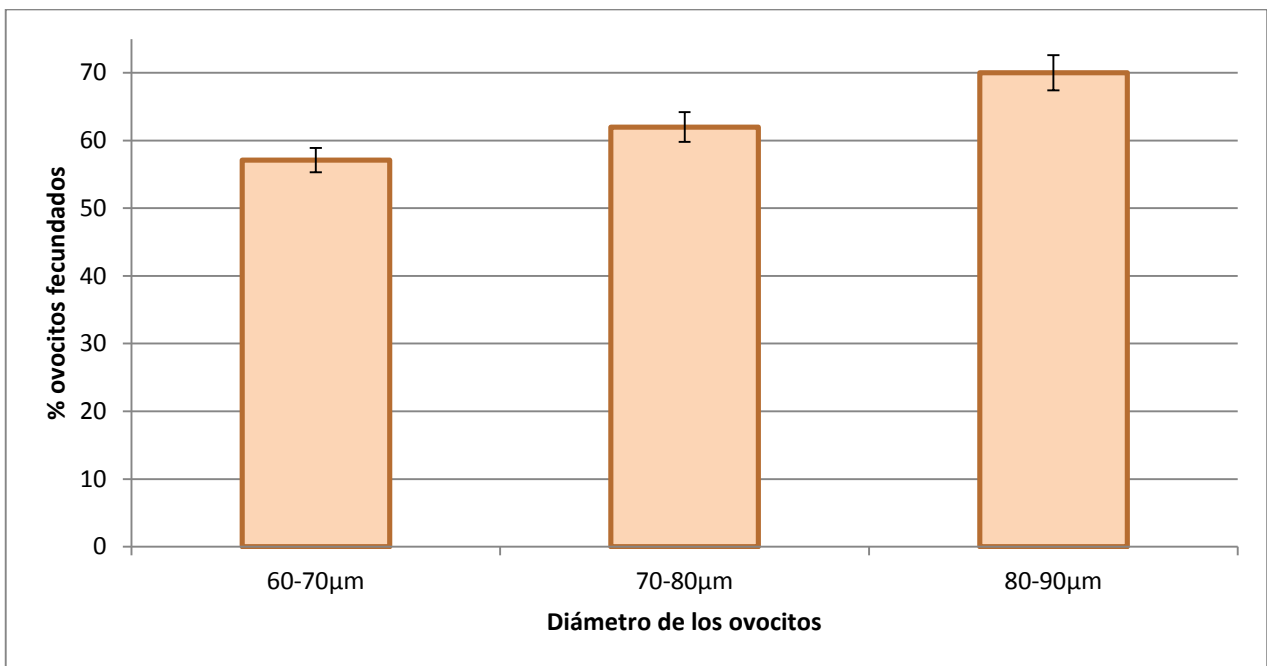
susceptible a ser fertilizado y podría desarrollar un embrión hasta formar un individuo. Estas medidas se obtuvieron de los ovocitos fertilizados del experimento.

Al determinar la cantidad de ovocitos que se fertilizaron y que permanecieron viables a las 24 horas de incubación. En la medida de los ovocitos se encontró que el 11.6% presentaba un diámetro entre 60 y 70 μm , el 48.3% un diámetro de 70 a 80 μm y el 40% un diámetro de 80 a 90 μm (grafica 1). Se observa que la mayor cantidad de ovocitos encontrados presentan un diámetro que oscila entre los 70 y 80 μm , los ovocitos que están entre los rangos de 60 y 70 μm fueron los menos comunes.



Gráfica 1.- Gráfica que representa el porcentaje de la cantidad de ovocitos encontrados en los diferentes rangos de diámetro de los ovocitos que permanecieron viables.

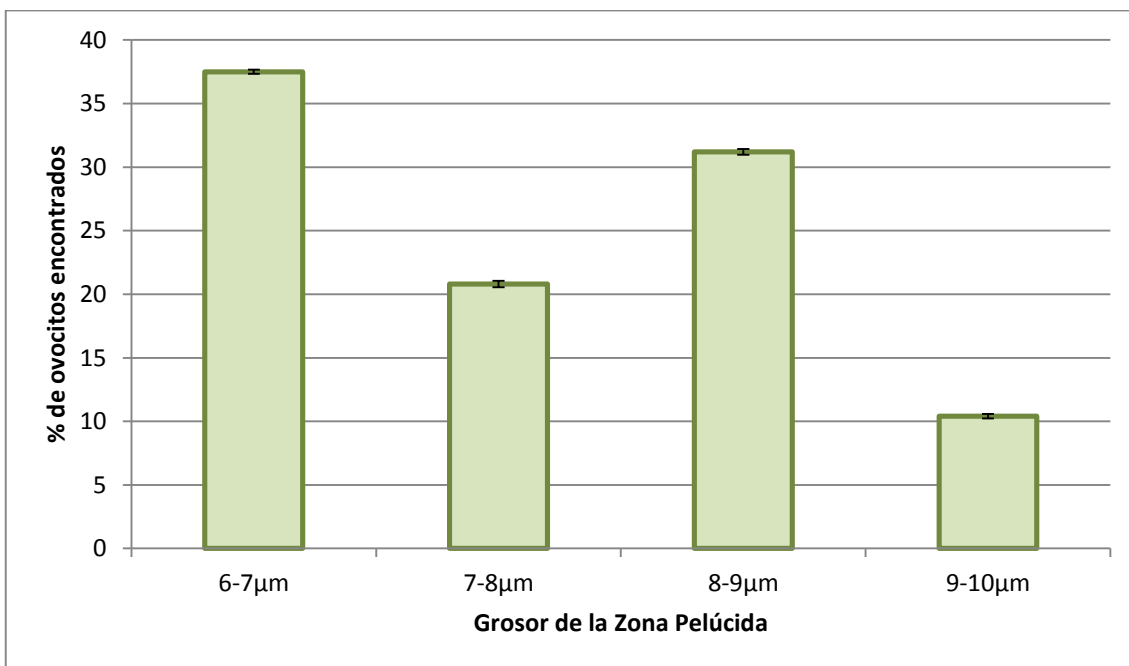
Se determinó el porcentaje de los ovocitos que se fecundaron en cada rango de diámetro y se encontró que entre 60 y 70 μm el 57.1 % de los ovocitos se fertilizaron, de 70 a 80 μm de diámetro el 62% y de 80 a 90 μm el 70%. Puede observarse que los ovocitos con un mayor índice de fertilización son los que encuentran en un rango de 80 a 90 μm (grafica 2).



Gráfica 2.- Gráfica que representa el porcentaje en los diferentes rangos de los ovocitos que se fecundaron. Puede apreciarse una relación entre el tamaño de los ovocitos y el éxito de la FIV.

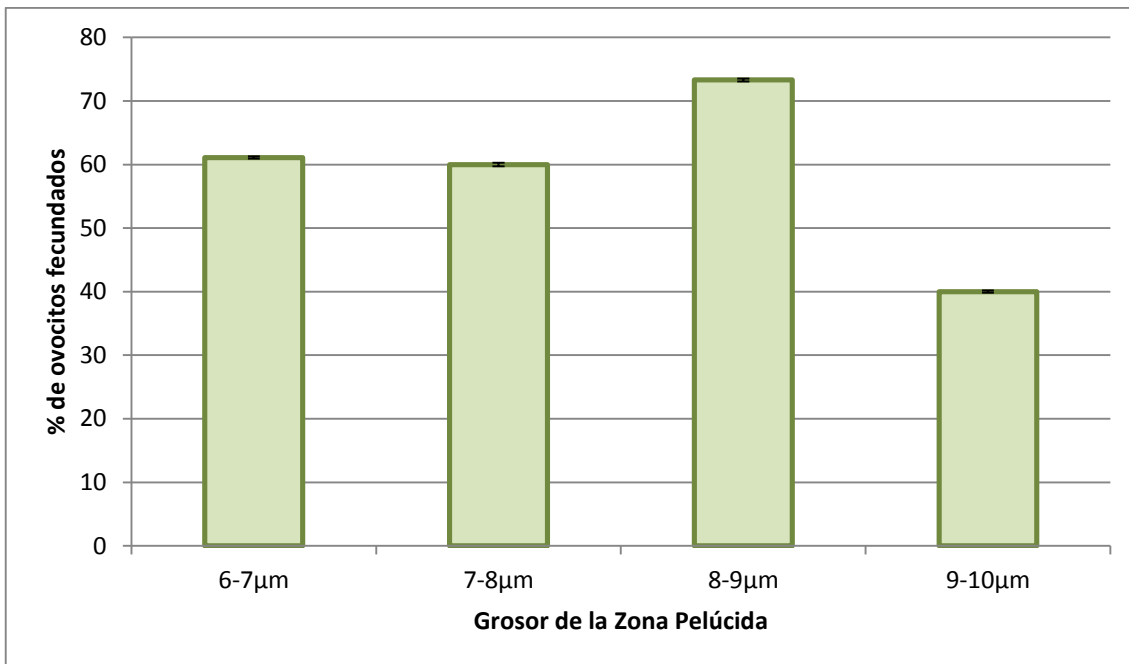
A pesar de que se encontró una mayor cantidad de ovocitos en las medidas de 70 y 80 μm los que tuvieron un mayor éxito en la fertilización fueron los que están entre las medidas de 80 y 90 μm .

Al determinar el grosor de la zona pelúcida de los ovocitos fecundados, se encontró que el 37.5% de ovocitos presentó una zona pelúcida entre 6 y 7 μm , el 20.8% una zona pelúcida de 7 a 8 μm , el 31.2% una zona pelúcida de 8 a 9 μm y el 10.4% una zona pelúcida de 9 a 10 μm (gráfica 3). Se puede apreciar que los ovocitos que presentan la zona pelúcida más delgada (6 a 7 μm) fueron los más comunes, en cambio los que tienen la zona pelúcida más gruesa fueron los menos encontrados.



Gráfica 3.- Gráfica que representa el porcentaje los ovocitos encontrados en diferentes rangos de grosor de la zona pelúcida de los ovocitos fecundados que permanecieron viables a las 24 horas de incubación a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%.

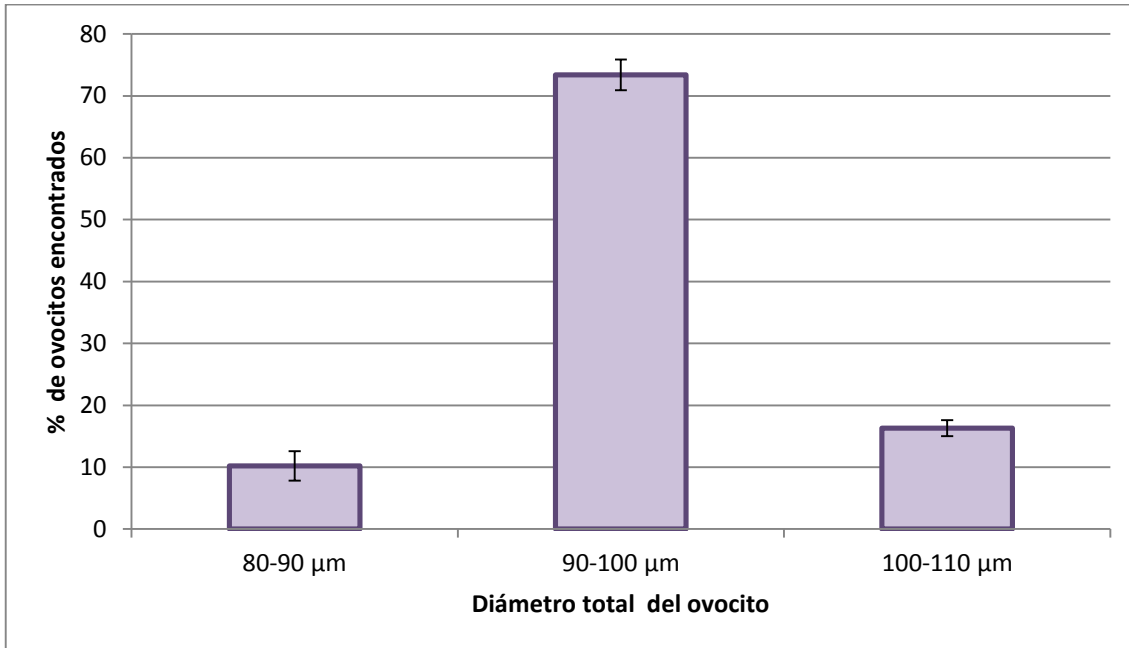
Al determinar los porcentajes de fertilización de acuerdo al grosor de la zona pelúcida de los ovocitos, se encontró que el 61.1% de ovocitos que presentaban un zona pelúcida entre 6 y 7 μm fueron fertilizados, de 7 a 8 μm se fertilizó el 60%, de 8 a 9 μm el 73.3% y de 9 a 10 μm el 40% (grafica 4). Como puede observarse el éxito de la fertilización fue menor en ovocitos con la ZP más gruesa.



Gráfica 4.-Gráfica que muestra la relación existente entre la fertilización *in vitro* y el grosor de la zona pelúcida de los ovocitos fecundados.

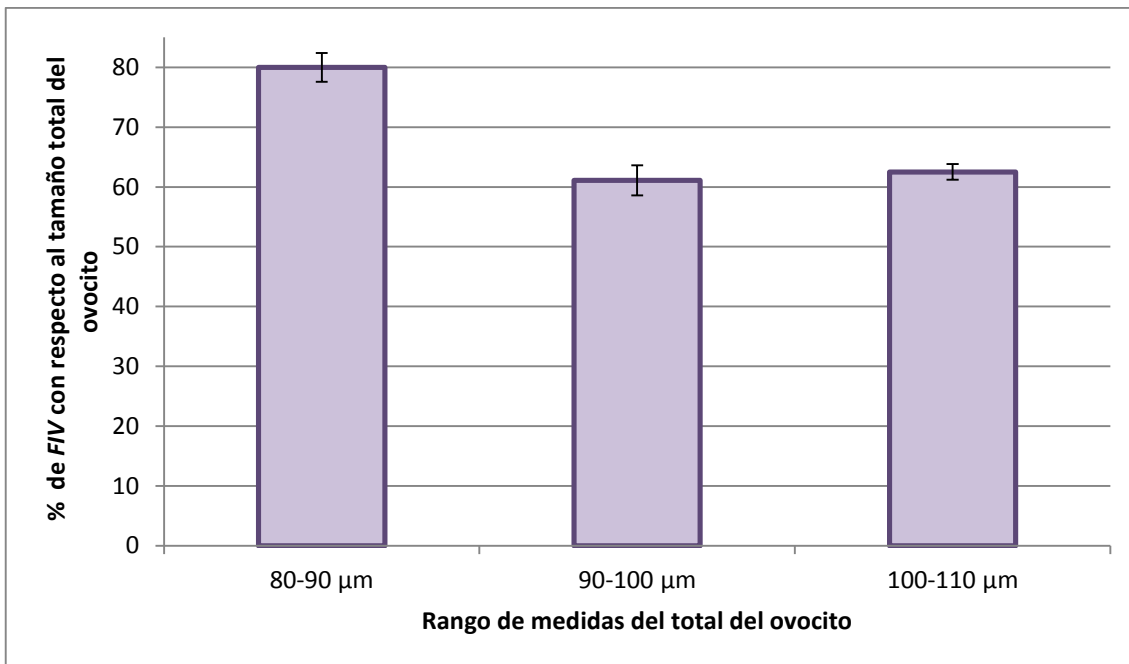
De esta forma los resultados nos indican que los ovocitos que presentan una zona pelúcida entre los rangos de 8 a 9 μm tienen un mayor índice de fecundación por *FIV*.

Al determinar el diámetro total del ovocitos (ZP+ ovocito) se encontró que el 10.2% de los ovocitos se encuentran en el rango de 80 a 90 μm , el 73.4% en 90 a 100 μm y el 16.3% en 100 a 110 μm (gráfica 5).



Gráfica 5. Gráfica que muestra el porcentaje de los ovocitos fecundados que se encontraron en los diferentes rangos del diámetro total de los ovocitos. Puede observarse que se encontró un mayor número de ovocitos en los rangos de 90 a 100 μm .

Al delimitar el porcentaje de ovocitos que fueron fertilizados exitosamente se encontró que el 80% de ovocitos de ellos presentaban un diámetro entre 80 y 90 μm , el 61.1% un diámetro de 90 a 100 μm y el 62.5% un diámetro de 100 a 110 μm (grafica 6). Puede observarse que mientras más grande sea el ovocito su éxito en la *FIV* decrece.



Gráfica 6.- La gráfica representa el porcentaje de fertilización relacionado con los rangos del diámetro total del ovocito (ZP+ ovocito). De acuerdo con los resultados de la gráfica puede decirse que los ovocitos que presentan un diámetro total entre 80 y 90 μm son los más susceptibles a ser fertilizados.

De la fertilización *in vitro* se obtuvieron cigotos en diferentes etapas, los cuales iban desde pronúcleos (masculinos y femeninos) (Figura 16) hasta mórula (Figura 17), estos sirvieron para la obtención de las medidas de los ovocitos maduros.

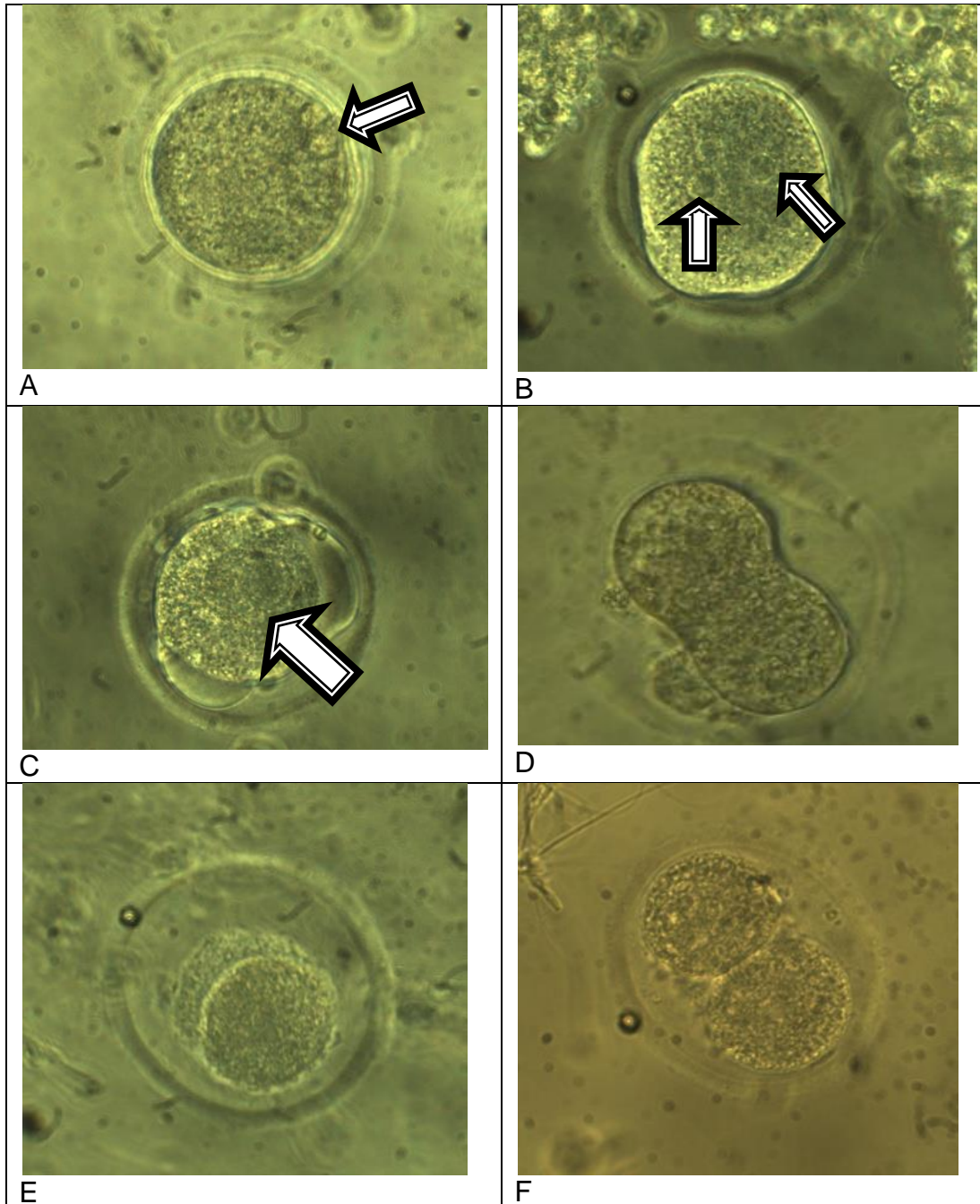


Figura 16.- Micrografía en microscopia de contraste de fases tomadas a 40 x que muestran ovocitos fecundados. Las imágenes A, B y C muestran cigotos con los pronúcleos masculino y femenino. La imagen D muestra un cigoto en etapa de 2 células y las imágenes E y F muestran un embrión en etapa de 2 células.

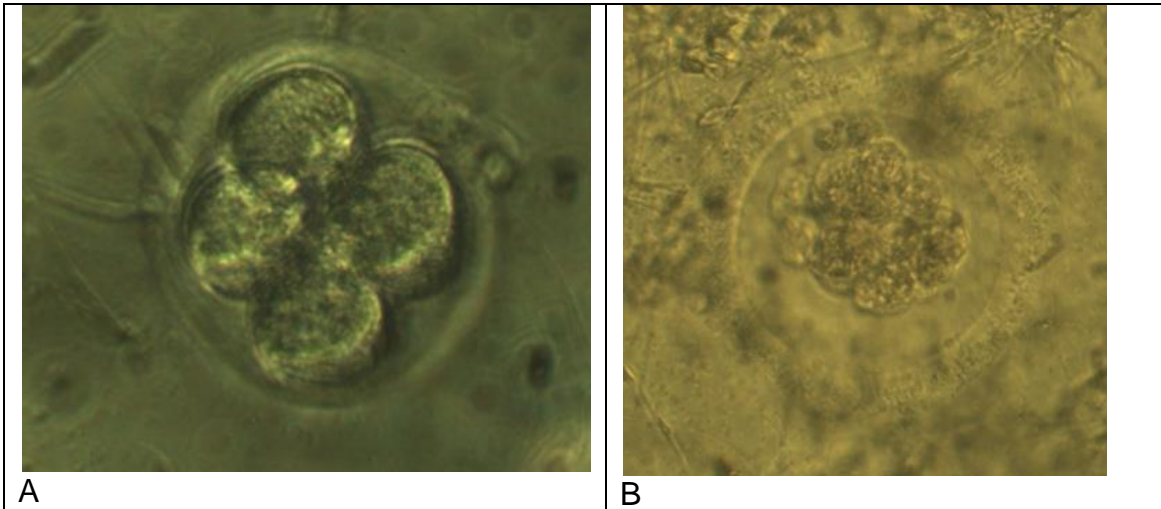


Figura 17.- Micrografía en microscopia de contraste de fases tomadas a 40x que muestra embriones en estadio de 4 y mas células, la imagen A muestra un embrión en etapa de 4 células y la imagen B muestra un embrión en etapa de mórula.

Discusión

El objetivo de este estudio fue evaluar los parámetros morfométricos que permitan identificar a un ovocito maduro nuclear y citoplasmáticamente para poder determinar si este es susceptible a ser fertilizado exitosamente.

Nuestros resultados indican que las medidas de los ovocitos son un método eficaz (pero no preciso) para determinar si se encuentra listo para ser fecundado.

Como se pudo comprobar en este estudio, la maduración del ovocito (citoplasmática) es necesaria para la fecundación y el desarrollo de un embrión, ya que los ovocitos que estaban maduros citoplasmáticamente fueron susceptibles a ser fecundados como lo menciona Martínez Madrid, 2002.

Chang y colaboradores (1999), Balaban y colaboradores (2006) reportan que la presencia de células de granulosa no son un indicativo de que el ovocito ha madurado y esté listo para su fecundación, esto coincide con nuestros resultados, ya que los ovocitos listos para ser fecundados ya no presentaron éstas células.

También se pudo comprobar que la maduración citoplasmática del ovocito ocurre antes de la ovulación debido a la acción de la FSH y no por las células del cumulo, como reporta Eppig et al 2001, ya que en nuestros resultados observamos que existió fertilización en los ovocitos que ya no contaban con células de la granulosa.

Ebner planteó que la ZP de todos los mamíferos oscila entre 12 a 15 μm , esto contrasta con Palma, el cual plantea que los diámetros están entre 15 y 20 μm , estos datos difieren con los nuestros ya que encontramos que la zona pelúcida de los ovocitos de ratón se encuentra entre 6 y 10 μm , y el tamaño óptimo de la ZP para la fecundación es de 8 a 9 μm .

Como pudimos observar en estos resultados el grosor de la zona pelúcida fue un indicativo muy importante para determinar si el ovocito se encontraba listo para su fecundación, Edie – Osagie (2003) reportan que los embriones con una zona pelúcida gruesa tienen una baja probabilidad de implantación, esto concuerda con los resultados obtenidos en esta tesis ya que los ovocitos que presentaron un grosor mayor de 10 μm no fueron fecundados.

De Santis (2007), reporta que la selección de ovocitos con las mejores características morfológicas no va a asegurar el éxito de la fertilización, como lo pudimos comprobar en este trabajo ya que se encontraron ovocitos que aparentemente contaban con una morfología normal y no fueron susceptibles a ser fertilizados.

La baja incidencia de ovocitos fertilizados puede deberse al medio de cultivo, al estado y edad de los ratones o a la acción de las hormonas sintéticas que se inyectaron para inducir la súper- ovulación. Por otro lado este bajo porcentaje también podría reflejar que los ovocitos a pesar de que presentan una morfología normal no son candidatos para las TRA y se requiere de parámetros morfométricos, como: el diámetro del ovocito, el grosor de la zona pelúcida y el diámetro total, para poder seleccionarlos.

Conclusiones

Los ovocitos ovulados de ratón que presentan un diámetro de 80 a 90 μm , se encuentran maduros nuclear y citoplasmáticamente, por lo tanto pueden ser fertilizados con éxito.

Los ovocitos ovulados de ratón que presentan un grosor de la ZP de 8 a 9 μm y un diámetro total de 90 a 100 μm son los más óptimos para la FIV y tienen un éxito mayor de fecundación.

El grosor de la zona pelúcida es un indicador significativo para determinar si un ovocito podrá ser fecundado.

Bibliografía

Austin, C. R. (1951) "Observations of the penetration of sperm into the mammalian egg," *Australian Journal of Scientific Research*, Series B, vol. 4, pages 581-596.

Balaban, B. and Urman, B. (2006). Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reproductive BioMedicine Online*, 12(5), pp.608-615

Barcat J.A. (2009) *Lazzaro Spallanzani y la inseminación artificial*. MEDICINA. 69 (4); 483-486)

Brevini, T., Cillo, F., Antonini, S. and Gandolfi, F. (2007). Cytoplasmic remodelling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. *Animal Reproduction Science*, 98(1-2), pp.23-38.

Cabrero Roura, L., Salvidar Rodríguez, D. and Cabrillo Rodríguez, E. (2007). *Obstetricia y medicina materno- fetal*. Madrid: Medica Panamericana, pp.167-170.

Carlson, B. and Kantaputra, P. (2014). *Embriología humana y biología del desarrollo*. Barcelona: Elsevier España.

CHANG, M. (1951). Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes. *Nature*, 168(4277), pp.697-698.

Chuaire, L.; Sánchez, M.C., (2002). *Células germinativas primordiales femeninas: Origen y migración hacia los primordios gonadales*. Colombia medica, 33 (4), 171-178. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=28333405>

Day, BN.; Abeydeera, LR. y Prather, RS. Recent progress in pig embryo production through *in vitro* maturation and fertilization techniques" In: Boar Semen Preservation IV. Ed: Johnson LA and Guthrie HD. Allen Press Inc., Kansas, USA, 2000: 81-92

De Lesegno, C., Reynaud, K., Pechoux, C., Thoumire, S. and Chastant-Maillard, S. (2007). Ultrastructure of canine oocytes during *in vivo* maturation. *Mol. Reprod. Dev.*, 75(1), pp.115-125.

De los Reyes, M., Palomino, J., Sepulveda, S., Moreno, R., Parraguez, V. and Barros, C. (2007). Evaluation of cortical granules and viability of canine oocytes during long-term *in vitro* maturation. *Veterinary Record*, 160(6), pp.196-198.

E.M., E. (2006). the spermatozoon. En: J. Niel and E. Knobil, ed., *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 3rd ed. Estados Unidos: Academic Press, pp.3-5.

Ebner T, Moser M, Sommergruber M. editors. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development. *Hum Reprod.* 2003;9:251-262

Ellederova, Z. (2004). Protein Patterns of Pig Oocytes During *In Vitro* Maturation. *Biology of Reproduction*, 71(5), pp.1533-1539.

Eppig, J. (1996). Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.*, 8(4), p.485

Eppig, J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122(6), pp.829-838.

Funahashi, H.; Cantley, TC. y Day, BN. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic AMP improves developmental competence following in vitro fertilization. *Biol Reprod* 1997b; 47: 679-686

Gabrielsen A, Lindenberg S, Petersen K. The impact of the zona pellucida thickness variation of human embryos on pregnancy outcome in relation to suboptimal embryo development. A prospective randomized controlled study. *Hum Reprod* 2001;16:2166-70

Izquierdo Rico, M. (2009). *Caracterización molecular y celular de la biosíntesis y composición de la zona pelúcida de ovocitos de hámster (Mesocricetus auratus). Análisis filogenético de la glicoproteína ZP4 en la subfamilia Murinae.* Doctorado. UNIVERSIDAD DE MURCIA.

Jiménez, L., Ruiz Gutiérrez, R. (2006). *Conocimientos fundamentales de biología, vol. 1.* México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Knobil, E. and Neill, J. (2006). *Knobil and Neill's physiology of reproduction.* Amsterdam: Elsevier.

Martínez Madrid B. Estudio de la fecundación "in vitro" en porcino: reducción de la poliespermia y optimización de la producción "in vitro" de embriones. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 2002

Matorras Weinig, R., Hernández Hernández, J. and Molero Bayarri, D. (2008). *Tratado de reproducción humana para enfermería.* Madrid: Editorial Médica Panamericana.

Mattioli, M.; Galeati, G. y Seren, E. Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. *Gamete Res* 1988a; 20: 177-183

Moore, K., Persaud, T. and Torchia, M. (2008). *Embriología clínica*. Barcelona: Elsevier.

Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosomal abnormalities. *Fertil Steril* 1995;64:382

Nagai, 1994; Nagai, T.; Takenaka, A.; Mori, T. y Hirayama, M. Effects of caffeine and casein phosphopeptides on fertilization *in vitro* of pig oocytes matured in culture. *Mol Reprod Dev* 1994; 37: 452-456

Ng, S., Chang, T. and Wu, T. (1999). Prediction of the rates of fertilization, cleavage, and pregnancy success by cumulus-coronal morphology in an *in vitro* fertilization program. *Fertility and Sterility*, 72(3), pp.412-417.

Niwa, K. Effectiveness of in vitromaturation and in vitrofertilization techniques in pigs. *J Reprod Fertil* 1993; 48 (Suppl):49-59

Palma GA. Producción *in vitro* de embriones bovinos. *Biotechnología de la Reproducción*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Buenos Aires. 2001;225-294.

Pehlivan, T. (2012). Clasificación del complejo corona-cúmulo-ovocito. In: J. Remohí Giménez., *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana*, 4th ed. Madrid: Medica Panamericana, pp.116-119.

Quezada Vidal, J. (2014). *Evaluación de la presencia de las caspasas 3 y 7 activas en los espermatozoides de rata, detección in situ vs ex situ*. Mestría. Universidad Autónoma Metropolitana.

Quintana, M., Campos, P., Herrera, P., Gallego, P. and Padrón, C. (2012). Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos inmaduros para fertilización *in vitro* fiv obtenidos de hembras *Bubalus bubalis* enviadas a matadero. *Rev. salud animal*, 34(1), pp.53-56.

Renton, J., Boyd, J., Eckersall, P., Ferguson, J., Harvey, M., Mullaney, J. and Perry, B. (1991). Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). *Reproduction*, 93(1), pp.221-231.

Reyes, M., Palomino, J., Parraguez, V., Hidalgo, M. and Saffie, P. (2011). Mitochondrial distribution and meiotic progression in canine oocytes during *in vivo* and *in vitro* maturation. *Theriogenology*, 75(2), pp.346-353.

Richard, F. (2007). Regulation of meiotic maturation. *Journal of Animal Science*, 85, pp.E4-E6.

Sadler, T. (2012). *Langman, embriologia médica (12a. ed.)*. Barcelona. Grupo Gen - Guanabara Koogan.

SENGER PL. Pathways to pregnancy y parturition. 2ed. Pullman: Current Conceptions Inc. USA; 1999.

Songsasen, N. and Wildt, D. (2007). Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation systems in the domestic dog. *Animal Reproduction Science*, 98(1-2), pp.2-22.

Soto-Suazo, M & Zorn T.M.. (2005). *Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects*. *Animal Reproduction*, 2 (3), 147-160.

Stricker,S.A. 2006. Structural reorganization of the endoplasmic reticulum during egg maturation and fertilization. *Sem. Cell Dev. Biol.*17: 303–13

Tamburrino, L., Marchiani, S., Minetti, F., Forti, G., Muratori, M. and Baldi, E. (2014). The CatSper calcium channel in human sperm: relation with motility and involvement in progesterone-induced acrosome reaction. *Human Reproduction*, 29(3), pp.418-428.

Thompson, JG. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 263-275

TOYODA, Y. and CHANG, M. (1968). Sperm Penetration of Rat Eggs *in vitro* after Dissolution of Zona Pellucida by Chymotrypsin. *Nature*, 220(5167), pp.589-591.

Tresguerres, J., López-Calderón, A. and Villanua Bernues, M. (2009). *Anatomía y fisiología del cuerpo humano*. Madrid: McGraw Hill.

Tsunoda, Y. and Chang, M. (1977). *In vitro* fertilization of hamster eggs by ejaculated or epididymal spermatozoa in the presence of male accessory secretions. *J. Exp. Zool.*, 201(3), pp.445-449.

Uñates, D., Guidobaldi, H., Gatica, L., Cubilla, M., Teves, M., Moreno, A. and Giojalas, L. (2014). Versatile Action of Picomolar Gradients of Progesterone on Different Sperm Subpopulations. *PLoS ONE*, 9(3), p.e91181.

Valdés, A., Pérez, H., García, R. and López, A. (2010). *Embriología Humana*. La Habana: Ciencias Médicas.

Vantman, D ; Vega M. (2010). *Reproductive physiology and evolutive changes with women age*. *Medica Clinica Condes*, 21 (3), 348 - 362.

Versión en inglés revisada por: Susan Storck, a. (2016). *Fecundación in vitro (FIV): MedlinePlus enciclopedia médica*. [online] Nlm.nih.gov. Available at: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/007279.htm>.

Watson, A. (2007). Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *Journal of Animal Science*, 85 (13_suppl), pp.E1-E3. Gandelman *et al.*, 2010