



Comparación de dos métodos de recogida de oocitos de coneja en su morfología y en su maduración y fecundación *in vitro*

Pedro L. Lorenzo*, Mario R. Alvariño¹, María J. Illera, Pilar G^a. Rebollar¹, Juan C. Illera y Mariano Illera

Departamento de Fisiología Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

¹ *Departamento de Producción Animal. E.T.S.I. Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid. Spain*

RESUMEN

El presente estudio ha sido realizado para caracterizar la morfología celular y meiótica de oocitos foliculares de coneja, así como su capacidad de madurar y fecundarse *in vitro* de acuerdo al método de obtención de los mismos. Los oocitos se recogieron de ovarios de conejas mediante (i) aspiración del contenido de los folículos o (ii) sección y ruptura de los mismos. Los oocitos así obtenidos se clasificaron en cinco grupos:

(A), rodeados de células del cúmulo;

(B) desnudos, pero con citoplasma intacto;

(C) con degeneración en las células del cúmulo;

(D) con degeneración en el citoplasma y

(E) con degeneración en cúmulo y citoplasma. En el experimento 1, los oocitos se clasificaron en estos cinco grupos y fueron fijados y teñidos para mostrar su estado nuclear.

En el experimento 2, los oocitos, clasificados de igual manera, se cultivaron *in vivo* durante 16 h en medio de cultivo de Brackett. En el experimento 3, los

oocitos madurados *in vitro* se fecundaron también *in vitro*. Al final de los experimentos 2 y 3, los oocitos también se fijaron y teñieron. Mediante la aspiración del contenido folicular, se recogieron un menor número de oocitos que mediante la sección de los folículos, aunque las proporciones de los oocitos recogidos fueron similares.

Sólo los oocitos sin alteraciones morfológicas (tipos A y B) mostraron una configuración nuclear normal de vesícula germinal y maduraron correctamente en un alto porcentaje. La

sección folicular provee de más oocitos, pero la aspiración se realiza más rápidamente. Los oocitos sin degeneración aparente maduran y se fecundan en un mayor porcentaje que los que sí la presentan.

Las características del citoplasma y del cúmulo que rodea los oocitos parecen ser los únicos indicadores de la capacidad potencial de maduración *in vitro* de los oocitos de coneja.

Palabras clave: Oocito. Maduración *in vitro*. Fecundación. Aspiración. Sección folicular.

INTRODUCCIÓN

Los oocitos y embriones de la coneja han sido muy utilizados para estos fines por ofrecer una serie de ventajas, como la de ser un animal cuya ovulación puede ser inducida, conocerse muchos de sus parámetros reproductivos y, además, ser un animal de fácil manejo (Fisher y Meuser-Odenkirchen, 1988). En condiciones fisiológicas, los oocitos de esta hembra doméstica se encuentran en el foliculo ovárico en un estado completamente inmaduro, el de dictiatio o vesícula germinal, en la profase de la primera división meiótica (Wassarman, 1988). Estos oocitos sólo iniciarán la maduración al producirse el pico de las gonadotropinas, pocas horas antes de la ovulación. Para imitar este proceso producido en condiciones *in vivo*, los oocitos capaces de madurar y ser fecundados *in vitro* deben cumplir ciertos criterios de uniformidad y homogeneidad, tanto en el citoplas-

ma como en el cúmulo celular que les rodea. Aunque la morfología y la caracterización de oocitos inmaduros obtenidos de grandes animales ha sido descrita en varios artículos hace ya tiempo (Hunter et al., 1976; Arlotto et al., 1990), hasta el momento los oocitos obtenidos de ovarios de coneja no han sido descritos suficientemente. Mediante el método de punción y aspiración del contenido folicular se recogen alrededor de un 60-70% de los oocitos foliculares, en su mayoría evaluados como morfológicamente normales (Leibfried y First, 1979; Katska et al., 1984). Sin embargo, con este procedimiento puede que un cierto número de oocitos queden en los foliculos sin ser aspirados.

Mediante el presente estudio se trata de caracterizar qué tipos de oocitos se recogen del ovario de la coneja y en qué proporciones, ya que, el incremento del número y la calidad de los oocitos madurados *in vitro* puede aumentar aquellos oocitos disponibles para fecundación. Además, las alteraciones surgidas durante la maduración de los oocitos representan una seria pérdida de eficiencia del ciclo IVM-IVF, con malos porcentajes de fecundación (Marrs et al., 1984; Zenzes et al., 1990), alta poliespermia (Hunter et al., 1976), pobre calidad embrionaria (Haines and Emes, 1991) y una baja tasa de nacimientos (Veeck, 1985).

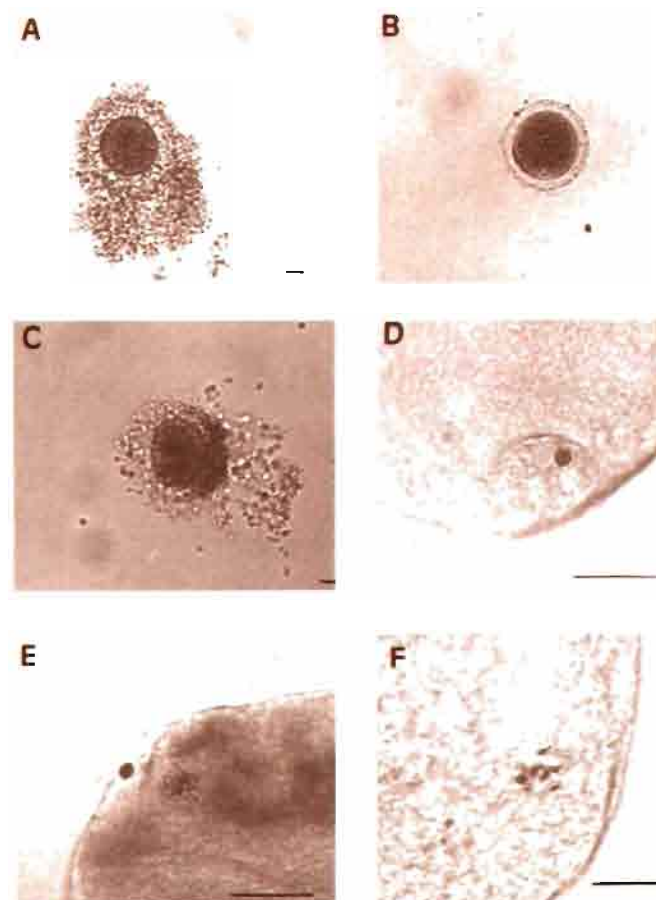
El presente trabajo compara los dos métodos más utilizados para la obtención de gametos femeninos del ovario: la aspiración del contenido folicular por un

lado, y la sección y posterior ruptura de los foliculos por otro. La comparación se realizó en base a los datos de recogida de oocitos, su morfología nuclear y celular, y su capacidad para ser madurados y fecundados *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales. Para este estudio se utilizaron conejas Blancas de Nueva Zelanda x California sexualmente maduras (3.5-4.5 kg). Todos los procedimientos realizados con los animales se hicieron de acuerdo a la directiva de la CE (Council Directive 86/609, 1986). Los animales se alojaron individualmente en jaulas de metal de dimensiones 32 cm x 52

Figura 1.- Fotografías de diferentes tipos de oocitos de coneja en el momento de su obtención: (A), de tipo A. Muestra un cúmulo celular compacto sin degeneración en el cúmulo ni en el citoplasma del oocito. (B), de tipo B. Oocito desnudo sin degeneración citoplásmica. (C), de tipo C. Se observa degeneración en el cúmulo celular. (D), de tipo D con degeneración en el citoplasma. (E), de tipo E con degeneración en citoplasma y cúmulo.





lular pero con degeneración en el mismo); oocitos tipo D (que presentan degeneración en el citoplasma) y oocitos de tipo E (con degeneración en cúmulo y citoplasma).

La degeneración se interpretó como tal cuando se observó vacuolización, citolisis, necrosis o pérdidas de la conformación esférica del oocito. Los oocitos obtenidos se cultivaron para su maduración en medio TCM 199 durante 16 horas, de acuerdo a procedimientos descritos anteriormente (Lorenzo et al., 1996).

Fecundación in vitro. Tras el periodo de maduración, los oocitos se fecundaron utilizando semen del mismo conejo, obtenido mediante vagina artificial. La preparación de espermatozoides para la fecundación consistió en un lavado de los espermatozoides obtenidos mediante su suspensión en 3 ml de medio de Brackett (Brackett y Oliphant, 1975) y dos centrifugaciones a 759g durante 5 minutos. En ambos casos se descartó el sobrenadante y los espermatozoides se resuspendieron otra vez en 3 ml de medio de Brackett. El sedimento final se resuspendió hasta una concentración de 50×10^6 espermatozoides/ml y se incubó durante 15 minutos a 37°C , 5% CO_2 y 100% de humedad relativa. Los oocitos se lavaron tras el tiempo de maduración *in vitro*, se introdujeron en el medio de fecundación (1 ml de medio de Brackett/5 oocitos) y se añadieron los espermatozoides (1×10^6 /ml). Después de 16 horas de la inseminación, los oocitos se colocaron en medio TCM199 y se examinaron a las 24 h para valorar su desarrollo.

Oocitos de eimerias, a la izquierda esporulados.

cm, en habitaciones de ambiente controlado (25°C , 45% humedad relativa) y un fotoperiodo de 16 h luz-8 h oscuridad. La comida se administró en forma de pellets (Lab Rabbit Chow, Purina Mills Inc: 16.2% proteína, 2.5% grasa y 13.5% fibra cruda) y fue restringida a 125 g/día. El agua fue administrada ad libitum. Los animales se mantuvieron en estas condiciones al menos durante 16 días antes de su utilización. Pasado este tiempo se sacrificaron mediante inyección endovenosa de pentobarbital sódico (30 mg/k) y sus ovarios fueron recogidos inmediatamente.

Obtención, clasificación y maduración in vitro de los oocitos. Los ovarios obtenidos fueron depositados en placas Petri de 60 mm de diámetro con P.B.S. 37°C a pH 7,4 y se colocaron bajo una lupa estereoscópica determinándose el número de

foliculos ováricos en cada caso, teniendo sólo en cuenta aquellos mayores de 1 mm de diámetro (Jelinkova et al., 1994). En uno de los dos ovarios obtenidos de cada coneja, se aspiró el contenido de los foliculos seleccionados, utilizando una jeringa estéril conectada a una aguja de 26 G de diámetro (18).

En el otro ovario, los foliculos fueron seccionados utilizando un microbisturí ocular. Los gametos femeninos se recogieron separadamente en placas Petri, y fueron examinados morfológicamente bajo un esteromicroscopio a 16x-25x, clasificándose en cinco tipos, de acuerdo al siguiente criterio: oocitos de tipo A (rodeados de un cúmulo celular compacto sin signos de degeneración); oocitos de tipo B (denudados de cúmulo celular pero sin signos degenerativos en el citoplasma); oocitos de tipo C (rodeados de cúmulo ce-



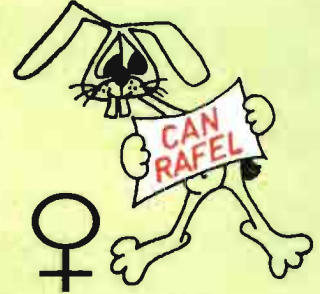
GRANGES CAN RAFEL, S.L.

CONEJOS REPRODUCTORES HIBRIDOS «HYCAT»

ABUELOS



GP 98
MACHO Abuelo
LINEA MATERNAL



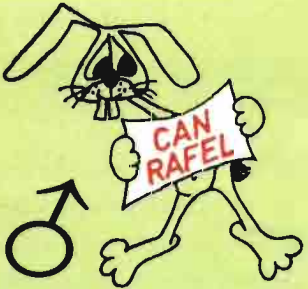
GP 99
HEMBRA Abuela
LINEA MATERNAL

TER 2000



TER 2000
Hembra Terminal. Peso adulto: 3,5 - 4,5 Kg.
Nacidos vivos: 9,70. Destetados: 8,95

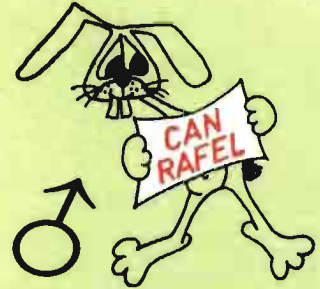
TERMINAL



TER SINTETICO
Macho Terminal semi-pesado
Peso adulto: 4,0 - 5,5 Kg.
Peso 63 días: 2,100 Kg.



TER PIRINEO
Macho Terminal pesado
Peso adulto: 4,7 - 6,0 Kg.
Peso 70 días: 2,650 Kg.



TER IBÉRICO
Macho Terminal pesado
Peso adulto: 4,7 - 6,0 Kg.
Peso 70 días: 2,650 Kg.

Les ofrecemos las hembras y machos abuelos para producir sus propias hembras de reposición, la TER. 2000. Además podrá adquirir machos Terminal Sintético, Terminal Pirineo y Terminal Ibérico (color), con los que conseguirá un buen rendimiento a la canal con el primero y un crecimiento extra rápido con el segundo y tercero.

NUCLEO DE SELECCIÓN "HYCAT"

Granges Can Rafel S.L.

Apdo. de Correos, 25 • 08580 SANT QUIRZE DE BESORA (Barcelona) SPAIN

E-mail: canrafel@logiccontrol.es

Tel. 00 34 3 852 90 02 - 852 91 36 - 852 91 27 • Fax 00 34 3 852 90 51

NUCLEO DE MULTIPLICACIÓN "HYCAT"

Granja Riudemeia

Can Riudemeia • 08310 ARGENTONA (Barcelona) • Tel. 00 34 3 797 15 29

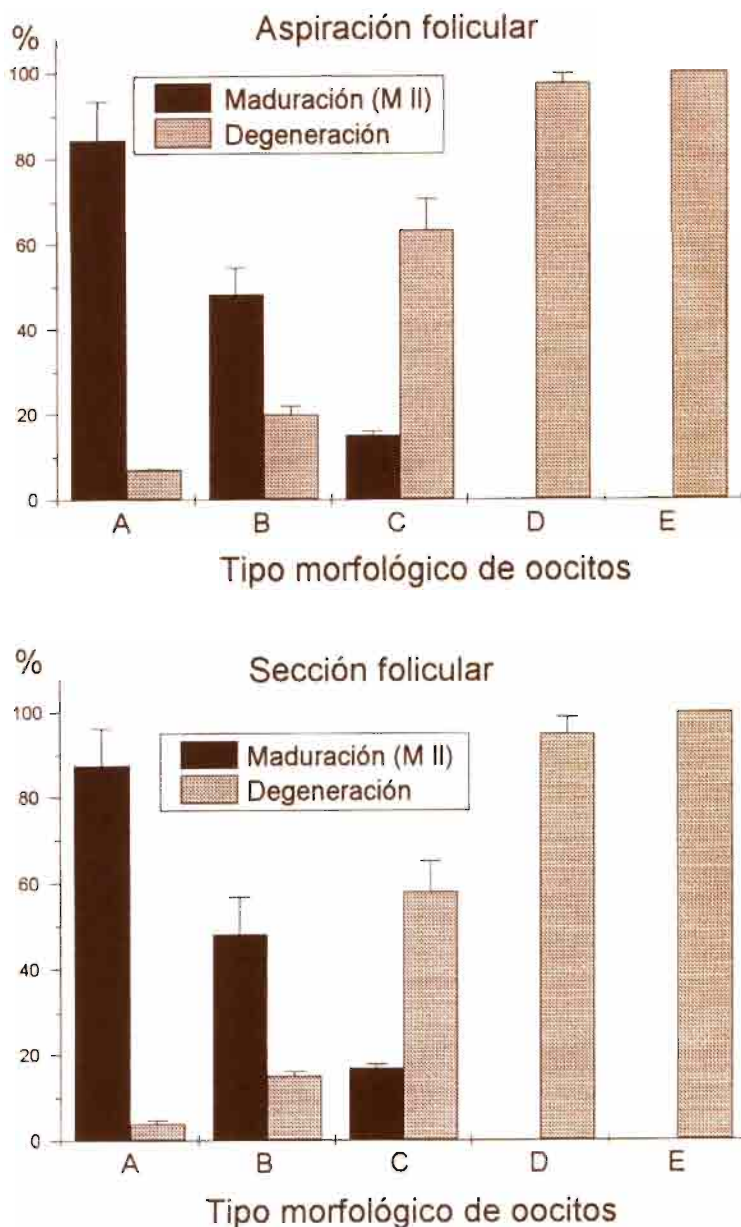
Tinción y criterios de maduración y fecundación. Al término de los periodos de cultivo, los oocitos se fijaron y tiñeron para comprobar los estadios de maduración nuclear alcanzados, de acuerdo a lo descrito previamente por Lorenzo et al. (1996). Brevemente, los oocitos se situaron en la superficie de un portaobjetos con cuatro gotas de silicona líquida en cada esquina, situando sobre ellas un

cubreobjetos que se presionó hasta que los oocitos contactaron con él. A continuación las preparaciones se sumergieron en ácido acético-etanol (1:3) y se tiñeron con orceína acética. Mediante este procedimiento las configuraciones nucleares observadas en los oocitos fueron: vesícula germinal (GV, caracterizada por la presencia de un núcleo rodeado de membrana nuclear), metafase I (M I, en la que los

cromosomas se encuentran separados y condensados al máximo) y metafase II o estadio de maduración nuclear (M II, en la que los cromosomas se encuentran condensados en estadio de metafase y se observa el primer corpúsculo polar). La figura 1 muestra ejemplos fotográficos de los oocitos utilizados y de algunos de los estadios meióticos analizados en este estudio. De la misma manera se procesaron los resultados de fecundación *in vitro*, apreciando el número de embriones que se habían desarrollado hasta el estadio de 2 células. Además, se valoraron aquellos que fueron polispermicos, que habían formado pronúcleos o que no fueron fecundados.



Figura 2.- Porcentajes de los oocitos que presentan maduración nuclear (estadio de metafase II) y de degeneración, en los distintos tipos morfológicos de oocitos obtenidos mediante aspiración folicular (a) o sección y ruptura folicular (b). Distintas letras en barras pertenecientes al mismo parámetro representan diferencias estadísticamente significativas (a vs b, $P < .01$).



Diseño experimental

Experimento 1. El experimento inicial se diseñó para determinar las diferencias existentes entre los dos métodos de recogida de oocitos. La comparación entre ambos se realizó analizando el número de oocitos recogidos, su morfología celular y su estadio nuclear. Estos oocitos se caracterizaron morfológicamente y se fijaron y tiñeron para mostrar su estadio meiótico como ha quedado expuesto anteriormente.

Experimento 2. Este experimento estudió la capacidad de los cinco grupos de oocitos morfológicamente distintos, obtenidos por aspiración o disección folicular, para madurar *in vitro*. Como ya se ha descrito, al final del periodo de maduración, los

oocitos se fijaron y tiñeron para valorar su estadio nuclear de maduración.

Experimento 3. El último experimento se realizó para averiguar la calidad de maduración de los distintos tipos de oocitos obtenidos en base a su capacidad de ser fecundados *in vitro*. Para ello, los oocitos se fijaron y tiñeron al final de este periodo. Aquellos que presentaron dos corpúsculos polares, pronúcleos masculino y femenino o llegaron al estadio de dos células, se consideraron fecundados correctamente.

Análisis estadístico. El experimento 1 se repitió 8 veces con diferentes grupos de ovarios, mientras que los experimentos 2 y 3 lo fueron 5 veces. En el primero de los experimentos, dos conejas actuaron como donantes de ovarios el mismo día, mientras que los oocitos de tres conejas se utilizaron el mismo día para los experimentos 2 y 3. Como el número de los oocitos cultivados en cada replicado fue pequeño y la frecuencia de los oocitos en cada categoría morfológica en que se dividieron también era pequeño, el test de Chi-cuadrado no pudo realizarse en el experimento 1. Sin embargo, los resultados al ser homogéneos se agruparon y la diferencia estadística entre ellos se determinó mediante el procedimiento Catmod del SAS (SAS/STAT, 1987). En los experimentos 2 y 3, los porcentajes obtenidos se compararon mediante el test de Chi-cuadrado (Yates, 1949). Sólomente los valores de P menores que 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Experimento 1.- Se obtuvieron un total de 242 oocitos de 288 folículos, procedentes de 33 ovarios. Mediante aspiración, se obtuvo una media de $9,3 \pm 0,5$ folículos y $6,9 \pm 0,6$ oocitos obtenidos por ovario. En el caso de la ruptura folicular, los valores medios obtenidos fueron de $8,0 \pm 0,6$ folículos y $7,7 \pm 0,8$ oocitos por ovario. En la Tabla 1 se muestran el número y porcentaje de oocitos recogidos, de acuerdo a la clasificación morfológica definida en el capítulo de material y métodos. La comparación entre los valores obtenidos para cada tipo de oocito, por aspiración o ruptura folicular, no presentaron diferencias significativas. Como ejemplo, mediante el método de aspiración folicular, se observó que sólomente los oocitos sin degeneración (tipos A y B) presentaron configuraciones nucleares normales (de vesícula germinal) y bajas tasas de degeneración nuclear en el momento de su obtención de los folículos ováricos. Sin embargo, en los oocitos obtenidos con algún tipo de degeneración morfológica (tipos C, D y E) los porcentajes de degeneración nuclear fueron muy altos desde el mismo momento de su obtención del folículo (42%, 60% y 100%, respectivamente).

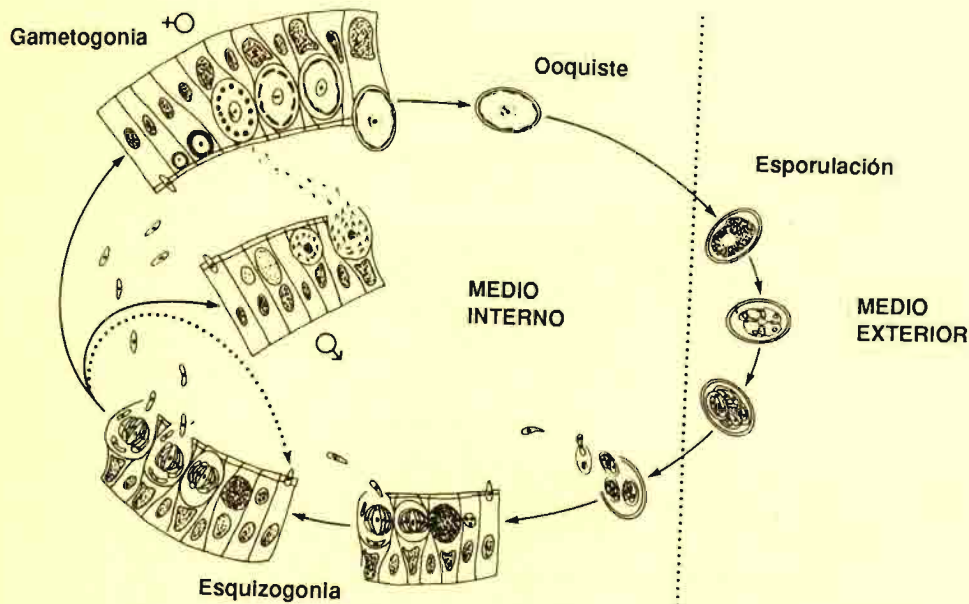
Experimento 2.- Para este experimento se maduraron *in vitro*, fijaron y tiñeron un total de 242 oocitos. En la figura 2 se muestra la distribución meiótica de los oocitos al final de su periodo de maduración *in vitro*, para cada método de recogida (figs. 2a

y 2b). Los oocitos con cúmulo celular y degeneración (A) alcanzaron siempre porcentajes de maduración más elevados ($P < 0.05$) que los oocitos desnudos (87,7% y 48,3%, respectivamente con el método de sección folicular) y sobre todo que en el caso de oocitos con degeneración morfológica (15,7%, 0% y 0%, respectivamente para los tipos C, D y E). En ninguno de estos parámetros estudiados se observaron diferencias significativas respecto del método de obtención de los oocitos.

Experimento 3.- En este estudio se maduraron y fecundaron *in vitro* 253 oocitos. De acuerdo con los datos expuestos en la Tabla 2, no existieron diferencias significativas en los parámetros de fecundación de acuerdo al método de obtención de los oocitos. Por otro lado, ninguno de los oocitos con signo de degeneración (tipos C, D y E) se fecundaron, mientras que los oocitos rodeados del cúmulo celular (tipo A) presentaron tasas de fecundación más elevadas que en los oocitos desnudos ($P < 0.05$) en ambos métodos de recogida.

DISCUSIÓN

Las características de los oocitos procedentes de folículos antrales han sido descritas en las hembras de distintas especies, como en la ratona (Erickson y Sorensen, 1974) o en la vaca (Leibfried y First, 1979). Sin embargo, aunque se han publicado estudios acerca de los oocitos de coneja y su capacidad para ma-



durar *in vitro* (Chang et al., 1955; Kauffmann et al., 1990; Jelinkova et al., 1994), en ellos no se han caracterizado, hasta el momento, ni el tipo de oocitos presentes en los folículos antrales ováricos, ni las peculiaridades de los dos métodos más comúnmente utilizados para la obtención de los mismos. Sobre el número de folículos de coneja registrados en este estudio, los datos obtenidos están de acuerdo con lo descrito por Gosalvez (1985), para folículos con un diámetro superior a 0,90 mm. Se escogió este tamaño folicular debido a que sólo los oocitos procedentes de folículos antrales mayores de estas dimensiones son competentes o capaces de madurar correctamente (Moore-Smith et al., 1978).

En otras especies, los estudios revisados señalan que mediante la ruptura folicular se recogen un

mayor número de oocitos que con la aspiración folicular (Arlotto et al., 1990; Lonergan et al., 1990), coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente estudio para la coneja. Una de las razones por las que se recogen menos oocitos mediante la aspiración folicular es la dificultad de separar las células del cúmulo celular, que rodean más íntimamente al oocito, del cúmulo ooforos. Sin embargo, los resultados obtenidos en cuanto a las proporciones de los cuatro tipos de oocitos, fueron similares tanto en la aspiración como en la ruptura folicular. Este hecho indica que las células del cúmulo que rodean al oocito no sufren pérdidas o roturas durante la aspiración. Esto es debido, probablemente, a la utilización de un calibre de aguja suficientemente ancho como para no dañar el cúmulo celular al paso del oocito. De esta manera, es preciso

señalar que la aspiración del contenido folicular es el más práctico de los dos métodos comparados para obtener oocitos foliculares en la coneja; por un lado permite conseguir una cantidad significativa de oocitos de buena calidad (tipo A) y por otro, se realiza en un periodo corto de tiempo, con lo que las oscilaciones de pH y temperatura o los peligros de contaminación del medio de cultivo, se reducen. Frente a todo esto, la ruptura folicular presenta la ventaja de obtener porcentajes de recuperación de oocitos en torno al 100%. Por lo tanto, la conveniencia en utilizar uno u otro método, sobre todo teniendo en cuenta que la calidad de los oocitos obtenidos es totalmente pareja, se basará preferentemente en el número de ovarios a procesar y en la experiencia del equipo que lo realice.

Todos los autores consultados afirman que hay una gran cantidad de factores que influyen en los porcentajes de maduración y fecundación *in vitro* de los oocitos. De hecho, el origen y la calidad de éstos oocitos son el primer factor que puede afectar positiva o negativamente en el éxito de estos procedimientos. En el presente estudio, en el momento de la obtención, los oocitos sin degeneración estaban rodeados o no de cúmulo celular. Sin embargo, los resultados de maduración y fecundación en nuestros experimentos mostraron que éstos fueron mejores en aquellos oocitos con cúmulo celular que en los que carecían del mismo. Esta incapacidad para madurar y ser fecundados de los oocitos desnudos ha sido descrita previamente para oocitos porcinos y

bovinos (Xu et al., 1986; Lorenzo et al., 1994). Este dato demuestra que la maduración requiere células del cúmulo, por medio del cual se transfiere un estímulo positivo que induce la maduración del oocito y favorece su fecundación 'posterios. La dependencia existente entre la apariencia morfológica del oocito y su cromatina nuclear intacta ha sido demostrada en el experimento 1; además, la relación entre los oocitos que tienen o no un grado de degeneración también ha sido observada en el experimento 2; finalmente, también este dato ha sido contrastado en el experimento 3, en relación a la exclusiva capacidad de los oocitos sin degeneración de ser fecundados con normalidad. Así, se sugiere que presencia de células del cúmulo, de un citoplasma y cromatina nuclear intactos y sin signos de degeneración pueden ser los únicos determinantes de la capacidad de los oocitos de coneja para madurar y ser fecundados correctamente. Por lo tanto, de acuerdo a los datos aportados en este estudio, si la capacidad de maduración y fecundación de los oocitos depende de su grado de degeneración, la selección de los oocitos recogidos, basada en su apariencia morfológica, debería realizarse siempre a priori como una prueba de la capacidad de desarrollo posterior in vitro.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a Teresa Calduch, Henar Montero y

Benedicto Jerónimo por su colaboración en este estudio. El presente trabajo ha sido realizado, en parte, gracias a un Proyecto de Investigación Complutense (PR49/98-7772).

BIBLIOGRAFÍA

- Arlotto, T.M., M.L. Lebfried-Rutledge y N.L. First. 1990. Size distribution and meiotic competence of bovine primary oocytes from two localizations in the ovary. *Theriogenology*, 33, 188.
- Brackett, B.G. y G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 12, 260-274.
- Chang, M.C.. 1955. The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in the Fallopian tubes. *J. exp. Zool.* 128, 379-405.
- Erikson, G.F. and R.A. Sorensen 1974. In vitro maturation of mouse oocytes isolated from late, middle, and pre-antral Graafian follicles. *J. Exp. Zool.* 190, 123-127.
- Fisher B. y G. Meuser-Odenkirchen. 1988. A 2 year follow-up of effects of biotechniques on reproduction in the domestic animals. *Lab. Anim.* 22, 5-15.
- Haines, C.J. y A.L. Emes. 1991. The relationship between follicle diameter, fertilization rate, and microscopic embryo quality. *Fertil. Steril.* 55, 205-207.
- Hosoi, Y., Y. Yoshimura, S.J. Atlas, T. Adachi y E.E. Wallach 1989: Effects of dibutyl cyclic AMP on oocyte maturation and ovulation in the perfused rabbit ovary. *J. Reprod. Fert.* 85, 405-411.
- Hunter, R.H.F., B. Cook y T.K. Baker. 1976. Dissociation of response to injected gonadotropin between Graafian follicles and oocytes in pigs. *Nature*, 260, 156-157.
- Jelinkova, L., M. Kubelka, J. Motlik y P. Guerrier. 1994. Chromatin condensation and histone H1 kinase activity during growth and maturation of rabbits oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 37, 210-215.
- Katska, L.. 1984. Comparison of two methods for recovery of ovarian oocytes from slaughter cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 7, 461-463.
- Kauffmann, R.A., R.T. Savoy-Moore, A. Sacco y M.G. Subramanian. 1990. The effect of cocaine on oocyte development and the follicular microenvironment in the rabbit. *Fert. Steril.* 54, 921-926.
- Leibfried, M.L. y N.L. First. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J. Anim. Sci.* 48, 76-86.
- Loneragan, P., E. Vergos, A. Kinis, H. Sharif, M. Gallaguer y I. Gordon. 1991. The effect of recovery method on the type of bovine oocyte obtained for in vitro maturation. *Theriogenology*, 35, 231.
- Lorenzo, P.L., M.J. Illera, J.C. Illera y M. Illera. 1994. Enhancement of cumulus expansion and nuclear during bovine oocyte maturation in vitro by addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *J. Reprod. Fert.* 101, 697-701.
- Lorenzo, P.L., P.G. Rebollar, M.J. Illera, M.J., J.C. Illera, M. Illera y J.M.R. Alvarino. 1996. Stimulatory effect of insulin-like growth factor-I α and epidermal growth factor on *in vitro* maturation of rabbit oocytes. *J. Reprod. Fert.* 107:109-117.
- Marrs, R.P., H. Saito, B. Yee, F. Sato y J. Brown. 1984. Effect of variation of in vitro culture techniques upon oocyte fertilization and embryo development in human in vitro fertilization procedures. *J. Fertil. Steril.* 41, 519-523.
- SAS/STAT 1987. Guide for personal computers. Version 6. Ed. SAS Inst. Inc. Cary, NC, USA.
- Smith, D.M., J.P. Tyler y G.F. Erickson. 1978. Effects of medium composition and progesterone on maturation in vitro of rabbits oocytes

Tabla 1. Diferencias obtenidas según los diferentes métodos para recoger oocitos foliculares en la coneja.

Método	n° ovarios	n° foliculos selecc.	n° oocitos obtenidos	n° foliculos/ ovario*	n° oocitos/ ovario*	% de recogida, (rango)	Porcentaje de oocitos en las diferentes clases morfológicas* (observados/total)				
							A	B	C	D	E
Aspiración	17	159	118	9±0.5 ^a (6-13)	6.9±0.6 ^a (4-14)	75.6 ^a (48.1-100)	72.0±4.6 ^a (85/118)	11.1±0.9 ^a (13/118)	7.6±1.0 ^a (9/118)	3.3±0.3 ^a (4/118)	5.9±0.3 ^a (7/118)
Sección	16	129	124	8.0±0.6 ^a (5-14)	7.7±0.8 ^a (3-14)	96.1 ^a (68.3-100)	76.6±5.8 ^a (94/124)	7.2±0.8 ^a (9/124)	5.5±0.8 ^a (7/124)	6.4±0.7 ^a (8/124)	4.0±0.3 ^a (5/1124)

* Valores en porcentaje ± SEM

¹ Espresado como oocitos recogidos / foliculos seleccionados x 100

³ No hubo diferencias estadísticas entre los dos métodos (p>0.05) Chi-cuadrado.

Tabla 2. Fecundación in vitro de oocitos madurados in vitro después de su obtención mediante aspiración o sección folicular.

Tipo de oocito	Oocitos inseminados	Aspiración folicular* (observados/total)			Oocitos inseminados	Sección folicular* (observados/total)		
		PN	2 células	Tasa de fecundación		PN	2 células	Tasa de fecundación
A	64	46.8a (30/64)	26.5a (17/64)	73.4a (47/64)	51	49.0a (25/51)	19.6a (10/51)	68.6a (35/51)
B	19	15.7b (1/19)	0.0b (0/19)	15.7b (1/19)	22	4.5b (1/22)	4.5b (1/22)	9.1c (2/22)
C	17	0.0c (0/17)	0.0b (0/17)	0.0c (0/17)	19	0.0c (0/19)	0.0b (0/19)	0.0c (0/19)
D	15	0.0c (0/15)	0.0b (0/15)	0.0c (0/15)	16	0.0c (0/16)	0.0b (0/16)	0.0c (0/16)
E	16	0.0c (0/16)	0.0b (0/16)	0.0c (0/16)	14	0.0c (0/14)	0.0b (0/14)	0.0c (0/14)

* Valores en porcentajes.

PN: pronúcleos; diferentes letras entre los valores de la misma columna indican diferencias significativas: a vs b, P<0.05; b vs c, P<0.05; a vs c, P<0.01

from Graafian follicles of different sizes. *J. Reprod. Fert.* 54, 393-400.

Veeck, L.L.. 1985. Extracorporeal maturation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 442, 357-367.

Wassarman, P.M.. 1988. The Mammalian Ovum. In: *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E. y Neil, E.D.

(ed). New York, Raven Press, pp. 69-102.

Xu, K.P., T. Greve, S. Smith y P. Hyttel. 1986. Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation in vitro. *Acta Vet. Scand.* 27, 505-519.

Yates, F.. 1949. The design and analysis of factorial experiments. Technical

Communication, *Imperial Bureau of Soil Science*, N° 35.

Zenzes, M.T., G. de Geyter, J. Bordt, H.P.G. Schneider y E. Niechlag. 1990. Abnormalities of sperm chromosome condensation in the cytoplasm of immature human oocytes. *Hum. Reprod.* 5, 842-846.