

EFFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO Y LA SUPLEMENTACIÓN PROTEICA EN LA MADURACION *IN VITRO* DE OVOCITOS BOVINOS*

EFFECT OF THE CULTURE MEDIUM AND PROTEIN SUPPLEMENTATION ON *IN VITRO* MATURATION OF BOVINE OOCYTES*

Ocaña Quèro, J.M.¹*, M. Moreno Millán¹, M. Pinedo Merlin² y A. Rodero Franganillo¹

¹Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria, Avda. Medina Azahara 9. 14005 Córdoba, España.

²Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Avda. Medina Azahara 9. 14005 Córdoba, España.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Vacuno. Meiosis. Medio TCM-199.

ADDITIONAL KEYWORDS

Cattle. Meiosis. TCM-199 Medium.

RESUMEN

En el presente trabajo se describen los efectos del medio de maduración ovocitaria y de la suplementación proteica sobre el proceso de maduración ovocitaria *in vitro* de oocitos inmaduros de vacuno. Para ello se usaron tres medios de cultivo diferentes, tales como: medio TCM-199, medio DME y medio H-Y, así como cuatro suplementos proteicos distintos (fluido folicular bovino: BFF; suero fetal bovino: FCS; fracción V albuminosa del suero bovino: BSA; y líquido amniótico bovino: BAF). Los índices de maduración ovocitaria obtenidos, usando el medio TCM-199, fueron significativamente superiores (81,8 p.100; $p < 0,01$ y $p < 0,05$ respectivamente) que los conseguidos con el medio DME (70,3 p.100) y el medio H-Y (76 p.100). En el segundo experimento, el porcentaje de oocitos que alcanzaron el estadio de metafase-II, cuando fueron cultivados en presencia de BFF (52 p.100; $p > 0,05$), fue superior al conseguido por los oocitos del grupo control (45,5 p.100), aunque tales

diferencias no fueron significativas. Por el contrario, los oocitos madurados en presencia de FCS (81 p.100), BSA (86,2 p.100) ó BAF (77,9 p.100) mostraron unos índices de maduración meiótica significativamente superiores ($p < 0,001$) a los conseguidos por el grupo control. En conclusión, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el medio TCM-199 fue superior, en cuanto al número de oocitos que alcanzaron el estadio de maduración, en comparación con los medios DME y H-Y. Así mismo, la suplementación proteica contribuyó a incrementar el porcentaje de oocitos que alcanzaron el estadio de metafase-II. Además, los mayores porcentajes de maduración se consiguieron cuando el medio de maduración se suplementó con FCS, BSA y BAF.

SUMMARY

In the present work, the effects of oocyte maturation medium and protein supplementation on *in vitro* maturation process of immature bovine oocytes are described. Three different culture media, such as:

*Este trabajo ha sido realizado gracias a una beca de investigación concedida por la Junta de Andalucía en colaboración con Cajasur.

**Correspondencia

TCM-199 medium, DME medium and H-Y medium, and four different protein supplements (bovine follicular fluid:BFF; fetal calf serum:FCS; albumen fraction V of bovine serum:BSA; and bovine amniotic fluid:BAF) were used. The oocyte maturation rates obtained using TCM-199 medium were significantly higher (81.8 p.cent; $p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively) than that obtained by DME medium (70.3 p.cent) and H-Y medium (76 p.cent). In the second experiment, the oocytes percentage which reached the metaphase-II stage when they were cultured in presence of BFF (52 p.cent; $p > 0.05$), was higher than that obtained in control group (45.5 p.cent), although such differences were not significant. By contrast, oocytes matured in presence of FCS (81 p.cent), BSA (86.2 p.cent) or BAF (77.9 p.cent) showed meiotic maturation rates significantly higher ($p < 0.001$) than that obtained in control group. In conclusion, the results obtained in the present work indicate that TCM-199 medium was superior on oocytes number that reached the maturation stage, in comparison with DME and H-Y media. In addition, protein supplementation contributed to increase the percentage of oocytes that reached the metaphase-II stage. Furthermore, the highest maturation percentages were obtained when maturation medium was supplemented with FCS, BSA and BAF.

INTRODUCCIÓN

El medio de cultivo constituye uno de los factores condicionantes de la capacidad de maduración *in vitro* de ovocitos inmaduros en las distintas especies de animales domésticos. En la actualidad, se han formulado una gran variedad de medios de cultivo cuya composición y finalidad es asegurar el mantenimiento de las necesidades metabólicas y energéticas que el ovocito requiere para su maduración fuera de su ambiente folicular. Entre los medios de cultivo más utilizados destacan el medio TCM-199, Ham F-10, F-12, MEM, etc. Todos ellos

son formulaciones complejas de aminoácidos, sales minerales, vitaminas, promotores del crecimiento, etc. Sin embargo, el medio TCM-199 es el más ampliamente utilizado en el cultivo de ovocitos en la especie bovina (Sirard y Bilodeau, 1990; Rose y Bavister, 1992).

Los medios de maduración son generalmente enriquecidos con una gran diversidad de suplementos, tanto séricos como hormonales, que favorecen la capacidad del ovocito para madurar *in vitro*: suero fetal de ternero (Saeki *et al.*, 1990), suero de vaca en celo (Kim *et al.*, 1990), suero albuminoso de bovino (Kane y Headon, 1980), diferentes tipos de hormonas luteotropas y foliculo estimulantes (Zuelke y Brackett, 1993), diversos factores de crecimiento (Lorenzo *et al.*, 1995), etc.

El objetivo principal del presente trabajo fue analizar, por una parte, cual de los tres medios de cultivo estudiados proporcionaba unos mayores índices de maduración *in vitro* de ovocitos inmaduros de vaca. Así mismo, se evaluó la capacidad que tienen diferentes suplementos proteicos, de evaluar la maduración meiótica *in vitro* de ovocitos de vacuno obtenidos a partir de vacas sacrificadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

LA OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL LÍQUIDO AMNIÓTICO

El líquido amniótico bovino fue obtenido a partir de úteros procedentes de vacas gestantes sacrificadas en el matadero. El estado de gestación de las vacas fue estimado entre 5-10 semanas, según el tamaño del feto (8 a 12 cm). Después de abrir el útero y exteriorizar la mem-

MADURACION *IN VITRO* DE OVOCITOS BOVINOS

brana amniótica, el líquido amniótico fue aspirado con una jeringa de 5 ml, centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos, inactivado a 56°C durante 30 minutos y finalmente se almacenó a -20°C hasta el momento de su utilización en el cultivo de los ovocitos.

LA OBTENCIÓN DEL LÍQUIDO FOLICULAR

Ovarios de vacas sacrificadas en matadero fueron recogidos y transportados al laboratorio en una solución salina equilibrada (NaCl, 0,9 p.100) y suplementada con antibióticos (10 µg/ml de estreptomina y 100 UI/ml de penicilina). Folículos ováricos con un diámetro entre 2-10 mm fueron aspirados utilizando una jeringa de 2 ml. El líquido folicular aspirado fue colocado en un pequeño tubo de ensayo y centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, el sobrenadante fue recogido, filtrado (filtro millipore de 0,22 µm de tamaño de poro), y almacenado a -20°C hasta el momento de su utilización.

LA RECOGIDA Y CULTIVO DE LOS OOCITOS

Ovarios procedentes de terneras y vacas (entre 1 y 5 años de edad) sacrificadas en el matadero, fueron transportados al laboratorio en una solución salina (NaCl, 0,9 p.100 P/V), suplementada con antibióticos (10 µg/ml de estreptomina y 100 UI/ml de penicilina) y mantenidos a una temperatura entre 30-37°C. Se aspiró el contenido de los folículos, con un diámetro entre 2-10 mm, con agujas de 18 G en jeringas de 2 ml. El líquido folicular aspirado fue colocado en una placa de cultivo de 3 cm de diámetro, y con la ayuda de un microscopio invertido y una micropipeta, se recogieron únicamente los ovocitos que muestra-

ban un cúmulo celular compacto y un citoplasma uniforme. A continuación, los ovocitos fueron lavados repetidas veces con una solución salina equilibrada (solución de Hank). Finalmente, los ovocitos fueron colocados en una placa de cultivo (entre 20-30 ovocitos por placa) conteniendo 2 ml de medio de maduración y se incubaron durante 24 horas en una estufa a 39°C, en ambiente húmedo y con un 5 p.100 de CO₂. El tiempo transcurrido desde la recogida de los ovarios hasta el cultivo de los ovocitos, para su maduración, fue aproximadamente de 3 horas.

EL DISEÑO EXPERIMENTAL

Experimento 1:

Con el objetivo de evaluar que medio de cultivo proporciona los mayores índices de maduración ovocitaria *in vitro* de ovocitos inmaduros de bovino, se establecieron tres grupos de ovocitos y se cultivaron de acuerdo con el siguiente esquema: 1) un grupo de oocitos fue madurado en el medio TCM-199 (Sigma), con 25 mM de HEPES, bicarbonato y suplementado con 0,2 p.100 de L-glutamina (Sigma), 0,2 p.100 de solución antibiótica-antimicótica (Sigma) y 10 p.100 de FCS. 2) Un segundo grupo de ovocitos se cultivó en el medio Dulbecco's Modified Eagle's (DME, Sigma) y suplementado con los mismos suplementos que en el caso anterior. 3) Un tercer grupo de ovocitos fue madurado en el medio H-Y (DME/NCTC 109 mixture, Sigma) y suplementado de igual forma que en los casos anteriores.

Experimento 2:

Con la finalidad de analizar el efecto de la suplementación proteica del medio

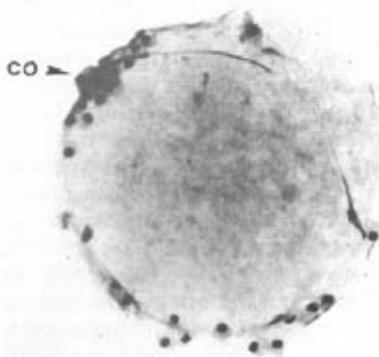


Figura 1. Ovocito inmaduro de bovino en el que aparece un citoplasma homogéneo y algunos grupos de células del cúmulo (CO), x 400. (Bovine immature oocyte showing a homogeneous cytoplasm and some cumulus cell groups (CO), x400).

de cultivo, sobre los porcentajes de maduración ovocitaria *in vitro* de ovocitos inmaduros de bovino, el medio básico de maduración TCM-199 con 25 mM HEPES, bicarbonato y 0,2 p.100 L-glutamina, fue suplementado de acuerdo con el siguiente esquema: 1) Un grupo de ovocitos fue cultivado en presencia de un 20 p.100 de BFF. 2) Un segundo grupo de ovocitos se cultivó en presencia de un 20 p.100 de BAF. 3) Un tercer grupo de ovocitos fue cultivado en el medio básico de maduración suplementado con un 20 p.100 de FCS. 4) un cuarto grupo de ovocitos fue madurado en presencia de 0,5 p.100 de BSA. 5) Y un último grupo de ovocitos fue cultivado en el medio TCM-199 sin suplementar, utilizándose como grupo control. El medio básico de maduración, en este segundo experimento, fue el medio TCM-199 en función de

los resultados óptimos obtenidos en el primer experimento en comparación con los demás medios estudiados. Sin embargo, sería también interesante analizar los índices de maduración ovocitaria que se obtendrían al emplear el medio H-Y, enriquecido con alguno de los suplementos utilizados en este segundo tratamiento, teniendo en cuenta que no existe tanta diferencia entre los medios TCM-199 y H-Y.

LA PREPARACIÓN CROMOSÓMICA DE LOS OOCITOS

Finalizado el periodo de incubación, los ovocitos fueron colocados en un pequeño tubo de ensayo conteniendo 3 ml de una solución hipotónica de citrato trisódico al 0,88 p.100 y 0,02 p.100 de tripsina. Tras una leve centrifugación (vortex), para eliminar las células de

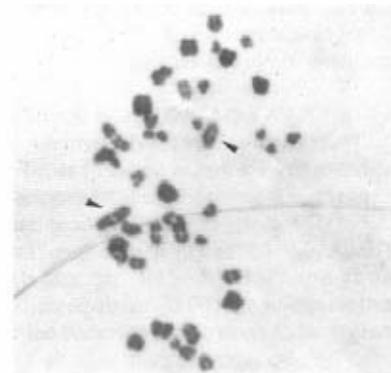


Figura 2. Ovocito en estadio de metafase-I. Se muestra un grupo de cromosomas bivalentes (flecha) y otro grupo de cromosomas individuales, x 1500. (Oocyte at metaphase-I stage. It is shown a group of bivalent chromosomes (arrow) and another group of individual chromosomes, x 1500).

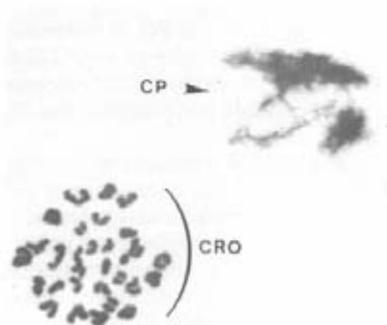


Figura 3. Ovocito en estadio de metafase-II. Se muestra un grupo de cromosomas (CRO) haploide ($N=30$) y el corpúsculo polar (CP) en interfase, $\times 1500$. (Oocyte at metaphase-II stage. It is shown a haploid chromosomes group (CRO; $N=30$) and the body polar (CP) at interphase stage, $\times 1500$).

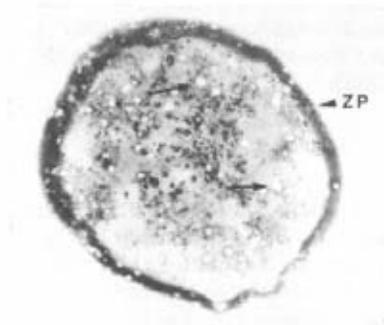


Figura 4. Ovocito degenerado en el que se puede apreciar la zona pelúcida (ZP) y un conjunto de vacuolas degenerativas a nivel citoplasmático (flechas), $\times 400$. (Degenerated oocyte showing the zona pelúcida (ZP) and a degenerative vacuoles group in the cytoplasm (arrows), $\times 400$).

cúmulo, los ovocitos fueron colocados en una placa de cultivo de 3 cm de diámetro conteniendo 2 ml de una solución hipotónica de citrato trisódico al 0,88 p.100 durante 45-60 minutos. A continuación, los ovocitos fueron fijados utilizando dos soluciones de fijador: una primera solución de metanol-ac. acético al 1:1 (v/v) durante 5 minutos, y una segunda solución de metanol-ac. acético al 3:1 (v/v) durante 24 horas. Finalmente, los ovocitos fueron colocados en portaobjetos desengrasados, teñidos con Giemsa al 5 p.100 en tampón Sorensen y observados al microscopio para analizar su estadio de maduración.

LOS CRITERIOS DE EVALUACIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron un total de cinco ensa-

yos por cada tratamiento, tanto en el primer experimento como en el segundo. Los ovocitos fijados, teñidos y extendidos fueron evaluados morfológicamente y clasificados, en función de su estadio meiótico, en las categorías siguientes: 1) Estadio de vesícula germinal (VG; **figura 1**): la membrana nuclear aparece intacta y la cromatina se muestra meióticamente inactiva; 2) Metafase I (MI; **figura 2**): la membrana nuclear aparece abierta y la cromatina se muestra condensada formando cromosomas visibles (bivalentes); 3) Metafase II (M-II; **figura 3**): El corpúsculo polar se hace visible en el espacio perivitelino y los cromosomas maternos aparecen perfectamente identificados; 4) Degeneración (DEG; **figura 4**): se muestra como un citoplasma valuolizado o fragmenta-

do. Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante un test de Chi-cuadrado (S.A.S Institute INC., 1982).

RESULTADOS

Los índices de maduración ovocitaria obtenidos en el experimento 1 están reflejados en la **tabla I**. El medio TCM-199 fue superior en soportar el proceso de maduración *in vitro* en comparación a los otros dos medios empleados. El porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadio final de maduración, tras su cultivo en el medio DME (70,3 p.100) o en el medio H-Y (76 p.100), fue inferior ($p < 0,01$ y $p < 0,05$ respectivamente) al obtenido por el medio TCM-199 (81,8 p.100). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de maduración observados en los medios DME y H-Y. Además, pudimos apreciar que los ovocitos madurados en presencia del medio TCM-199 muestra-

ban un citoplasma más homogéneo sin signos degenerativos. Por el contrario, los ovocitos madurados en los medios DME y H-Y mostraban un citoplasma muy vacuolizado con signos claros de degeneración.

En la **tabla II** se muestra los porcentajes de maduración obtenidos por los ovocitos tras su maduración en presencia de distintos tipos de suplementos proteicos. La adición de suplementos proteicos al medio de cultivo de ovocitos inmaduros favoreció el porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase-II, en comparación con el grupo de ovocitos que fueron madurados en un medio sin enriquecer. En este sentido, cuando los ovocitos fueron cultivados en presencia de BFF (52 p.100) el índice de maduración fue superior ($p > 0,05$) al observado en el grupo control (45,5 p.100). Aunque, no se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos. Por el contrario, los porcentajes de ovocitos, que alcanzaron el estadio de metafase-II en presencia de BSA (86,2 p.100), FCS (81

Tabla I. Índices de maduración meiótica de ovocitos inmaduros bovinos obtenidos tras su cultivo en diferentes medios de maduración. (Meiotic maturation rates of immature bovine oocytes obtained after culturing in different maturation media).

Tipos de medios	Número de ensayos	Número de ovocitos cultivados	VG	ovocitos (p.100)		DEG
				M-I	M-II	
TCM-199	7	314	4,5±0,4	8,2±0,8	81,8±4,3 ^a	5,5±0,5
DME	7	321	12,4±1,2	10,3±1,0	70,3±3,9 ^{b,c}	7±0,7
H-Y	7	318	11±1,1	9,4±0,9	76±4,0 ^{ab}	3,6±0,3

VG: vesícula germinal; M-I: metafase-I; M-II: metafase-II; DEG: degenerados. Los datos se muestran como porcentajes medios ± EEM de un total de 7 ensayos por tratamiento.

a-d: Letras distintas, dentro de la misma columna, indican diferencias significativas.

(a,d) valores difieren estadísticamente ($p < 0,05$)

(a,c) valores difieren estadísticamente ($p < 0,01$)

MADURACION *IN VITRO* DE OVOCITOS BOVINOS

Tabla II. Índices de maduración meiótica obtenidos tras el cultivo de oocitos inmaduros en el medio básico de maduración (TCM-199) enriquecido con cuatro suplementos proteicos diferentes. (Meiotic maturation rates obtained after culturing the immature oocytes in the basic maturation medium (TCM-199) enriched with four different protein supplements).

Tipos de suplementos	Número de ensayos	Número de ovocitos cultivados	VG	ovocitos (p.100)		
				M-I	M-II	DEG
FCS	7	320	3,5±0,3	7,5±0,7	81±4,2 ^a	8±0,8
BSA	7	316	1,8±0,1	5±0,6	86,2±4,5 ^a	7±1,2
BAF	7	322	7,1±0,7	8,2±0,8	77,9±3,7 ^a	6,8±0,6
BFF	7	325	26,1±2,1	11,4±1,3	52±3,3 ^b	10,5±1,2
Control	7	315	28,8±2,3	10,3±1,2	45,5±3,1 ^b	15,4±1,5

VG: vesícula germinal; M-I: metafase-I; M-II: metafase-II; DEG: degenerados. Los datos se muestran como porcentajes medios±SEM de un total de 7 ensayos por tratamiento.

a,b: Letras distintas dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,001$).

p.100) y BAF (77,9 p.100), fueron significativamente superiores ($p < 0,001$) a los conseguidos en el grupo de ovocitos suplementado con BFF (52 p.100) y en el grupo control (45,5 p.100).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el primer experimento indican que el medio TCM-199 proporciona unos mayores porcentajes de maduración ovocitaria *in vitro* en comparación con los medios DME y H-Y. El medio TCM-199 ha sido ampliamente usado en virología y en la producción de vacunas, así como para el cultivo *in vitro* de implantes primarios de células epiteliales pancreáticas de ratón y de células del cristalino en rata (Ryan y Walk, 1979; Bolton *et al.*, 1982). Además, el medio TCM-199 es el más usado en el cultivo de ovocitos y embriones de distintas especies de animales domésticos (Nakanishi *et al.*, 1990; Willis *et al.*,

1990). Nosotros creemos que la acción beneficiosa del medio TCM-199 se podría deber al alto contenido en aminoácidos, vitaminas y promotores del crecimiento. Además, el medio TCM-199 contiene tampón Hepes que con un Pka de 7,37 a 37°C, proporciona el máximo grado de amortiguación cuando es añadido a un medio tamponado de fosfato-bicarbonato al pH óptimo y al rango de temperatura necesario para la mayoría de las células en cultivo. Se ha descrito que la concentración óptima de tampón Hepes en el medio de cultivo es de 25 mM, concentraciones más bajas de Hepes proporciona un menor efecto amortiguador, y a concentraciones mayores serían tóxicas para algunas líneas celulares (Shipman, 1969).

El medio DME se origina a partir de las modificaciones llevadas a cabo, en el medio Basal Medium Eagle (BME), por Dulbecco y Freeman. El uso del medio DME fue descrito por primera vez para el cultivo de células embrionarias de

ratón, y más recientemente, cuando se suplementa convenientemente, para facilitar el crecimiento de numerosos tipos de cultivos celulares (Kolodny, 1976; Fisher y Goldstein, 1977; Goodman, 1978). Cuando los ovocitos fueron cultivados en el medio DME, los índices de maduración obtenidos fueron los más bajos al compararlos con los índices obtenidos en los medios TCM-199 y H-Y. Nosotros sugerimos que este pobre efecto del medio DME puede ser debido a la relativamente pobre composición química, si lo comparamos con los otros medios de cultivo. Además, el medio DME no contiene el amortiguador Hepes, el cual es un factor muy importante en el tamponamiento del pH del medio de cultivo.

El medio H-Y constituye una fuente nutricional muy completa que proporciona determinados factores fisiológicos y que está especialmente diseñado para mantener el desarrollo de líneas celulares híbridas en cultivo. En nuestro experimento, el medio H-Y proporcionó unos índices de maduración óptimos, los cuales fueron superiores a los conseguidos por el medio DME, e inferiores a los obtenidos por el medio TCM-199. Nosotros pensamos que la acción positiva del medio H-Y podría radicar en su composición química, la cual proporciona una amplia variedad de vitaminas, aminoácidos y sobre todo factores de crecimiento, entre los que destaca la insulina. Se ha descrito que la insulina actúa como factor de crecimiento en la maduración ovocitaria y en posteriores estadios de desarrollo en vacuno (Zhang *et al.*, 1991).

En el segundo experimento, se estudió el papel de la suplementación proteica en la maduración ovocitaria *in vitro* de

ovocitos inmaduros bovinos. Los datos obtenidos indican que dicha suplementación proteica contribuye a mejorar los porcentajes de ovocitos que alcanzan el estadio final de maduración. En general, todos los suplementos proteicos proporcionaron unos niveles de maduración superiores a los conseguidos por el grupo control. Es conocido que el líquido folicular ejerce una acción represora de la maduración meiótica ovocitaria (Edwards, 1974; Sirard *et al.*, 1992). Se postula que quizás exista una proteína involucrada en el control de la reducción meiótica. Sato y Koide, (1988) aislaron un pequeño péptido (< 10KD), en el líquido folicular bovino, capaz de inhibir la maduración de ovocitos de ratón en cultivo. Anteriormente, Tsafriri *et al.* (1976) encontraron una pequeña molécula, en el líquido folicular porcino, que era activa en la inhibición de la división meiótica en ratón, como fue demostrado por Downs y Eppig, (1987).

El suplemento proteico FCS, añadido al medio básico de maduración, proporcionó unos elevados índices de maduración. Estos resultados son similares a los conseguidos por Mochizuki *et al.* (1988), Willis *et al.* (1990) y Totey *et al.* (1991). Presumiblemente, el efecto beneficioso del suplemento FCS sea debido a la existencia de un componente (fetuín) que actúa como factor activador de la maduración ovocitaria *in vitro* (Allen *et al.*, 1982; Sanbuissho y Threlfall, 1990).

De igual forma, cuando el medio de maduración fue suplementado con líquido amniótico bovino, los porcentajes de maduración ovocitaria fueron superiores a los conseguidos en el grupo de ovocitos control y parecidos a los alcanzados por

los suplementos FCS y BSA. Los líquidos fetales (líquidos amniótico y alantoideo) son también usados en la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos (Ocaña *et al.*, 1994), en la fertilización humana *in vitro* (Gianaroli *et al.*, 1986) y en el cultivo *in vitro* de embriones de ratón y humano (Gianaroli *et al.*, 1986; Fugger *et al.*, 1988; Dorfmann *et al.*, 1989; Javed *et al.*, 1990). Algunos autores sugieren que los líquidos fetales contienen altas concentraciones de electrolitos, creatina, urea, glucosa, fosfato, correctores iónicos y no iónicos y promotores del crecimiento que proporcionan un excelente desarrollo embrio-nario y elevados índices de maduración, sin necesidad de cualquier otro tipo de suplementación (Wales, 1970; Reeves, 1972; Gianaroli *et al.*, 1986).

Finalmente, los mayores porcentajes de ovocitos, que alcanzaron el estadio de metafase II, fueron obtenidos cuando el medio básico de maduración fue enriquecido con BSA. Estos resultados fueron similares a los encontrados por Kane y Headon, (1980) en conejo y por Quinn *et al.* (1982) en ratón. Kane, (1985) postuló que el efecto del BSA parece radicar en la presencia de una proteína de bajo peso molecular. Sin embargo, existen algunas especies de animales domésticos, como

es el caso del cerdo, en los que la acción de la BSA no es tan favorable como en el vacuno (Leibfried *et al.*, 1986; Zheng y Sirard, 1992).

En conclusión, los resultados obtenidos indican que el medio TCM-199 proporcionó mayores índices de maduración ovocitaria en comparación con los medios DME y H-Y. Además, la suplementación proteica contribuye de una manera importante a la maduración *in vitro* de ovocitos inmaduros de bovino, siendo los suplementos FCS, BSA y BAF los que proporcionaron unos porcentajes de ovocitos madurados más elevados. Sin embargo, es necesario llevar a cabo otros trabajos para comprobar si los ovocitos madurados en presencia de este tipo de suplementos proteicos, son óptimos o no para su posterior fecundación y desarrollo embrionario.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Sr. J.M. Rodero por su estimable ayuda en el análisis estadístico, y a todo el personal del Matadero Municipal y especialmente a su Director técnico Sr. A. Paniagua por el suministro de los ovarios de vacuno.

BIBLIOGRAFÍA

- Allen, R.L., K.R. Bondioli and R.W. Jr. Wright. 1982. The ability of fetal calf serum, new-born calf serum and normal steer serum to promote the *in vitro* development of bovine morulae. *Theriogenology*, 18:185-189.
- Bolton, W.E., S.P. Terrell, K.L. Andrews and A.E. Boyd. 1982. III, *Tissue Culture Methods*, 7:39.
- Dorfmann, A.D., S.D. Bender, P. Robinson, E.F. Fugger, M. Bustillo, G. Reed and J.D. Schulman. 1989. Cell-free human amniotic fluid as culture medium for mouse and human embryos. *Fertil. Steril.*, 51:671-674.
- Downs, S.M. and J.J. Eppig. 1987. Induction of mouse oocyte maturation *in vivo* by perturbamts

- of purine metabolism. *Biol. Reprod.*, 36: 431-437.
- Edwards, R.G. 1974. Follicular fluid. *J. Reprod. Fert.*, 37: 189-219.
- Fisher, P.B. y N.I. Goldstein. 1977. TCA Manual, 3: 625.
- Furgger, E.F., M. Bustillo, A. Dorfmann and J.D. Schulman. 1988. The effect of human amniotic fluid on *in vitro* development of mouse embryos. *Biol. Reprod.*, 36: 117 abstr.
- Gianaroli, L., R. Seracchioli, A.P. Ferraretti, A. Trounson, C. Flamigni and L. Bovicelli. 1986. The successful use of human amniotic fluid for mouse embryo culture and human *in vitro* fertilization embryo culture and transfer. *Fertil. Steril.*, 46: 907-913.
- Goodman, K.C. 1978. TCA Manual 4: 929.
- Javed, M.H. and Jr. R.W. Wright. 1990. Bovine amniotic and allantoic fluids for the culture of murine embryos. *Theriogenology*, 34: 445-458.
- Kane, M.T. 1985. A low molecular weight extract of bovine serum albumin stimulates rabbit blastocyst cell division and expansion *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 73: 147-150.
- Kane, M.T. and D.R. Headon. 1980. The role of commercial bovine serum albumin preparation in the culture of one-cell rabbit embryos to blastocysts. *J. Reprod. Fertil.*, 60: 469-475.
- Kim, C.I., J.E. Ellington and R.H. Foote. 1990. Maturation, fertilization and development of bovine oocytes *in vitro* using TCM-199 and a simple defined medium with co-culture. *Theriogenology*, 33: 433-439.
- Kolodny, G.M. 1976. TCA Manual, 3: 551.
- Leibfried-Rutledge, M.L., E.S. Critser and N.L. First. 1986. Effect of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. *Biol. Reprod.*, 35: 850-857.
- Lorenzo, P.L., M.J. Illera, J.C. Illera and M. Illera. 1995. Role of EGF, IGF-I, sera and cumulus cells on maturation *in vitro* of bovine oocytes. *Theriogenology*, 44: 109-118.
- Mochizuki, H., Y. Fukui and H. Ono. 1991. Effect of the number of granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 36: 973-985.
- Nagai, T., T. Takahashi, Y. Shioya and N. Oguri. 1990. Maturation and fertilization of pig follicular oocytes cultured in pig amniotic fluid. *Theriogenology*, 34: 195-203.
- Nakanishi, Y., Y. Uto, K. Goto and K. Ogawa. 1990. The effect of different media and serum supplements upon porcine oocyte maturation. *Theriogenology*, 33: 291.
- Ocaña Quero, J.M., M. Moreno Millán, M. Valera Córdoba and A. Rodero Franganillo. 1994. The influence of different types of media supplement on the meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 41: 405-411.
- Quinn, P., J.D. Stanger and D.G. Whittingham. 1982. Effect of albumin on fertilization of mouse ova *in vitro*. *Gamete Research*, 6: 305-313.
- Reeves, J.T., F.S. Daoud, M. Gentry and C. Eastin. 1972. Changes in urinary flow in bovine fetuses during late gestation: composition of amniotic and fetal body fluids. *Am. J. Vet. Res.*, 33: 2159-2167.
- Rose, T.A. and B.D. Bavister. 1992. Effect of oocyte maturation medium on *in vitro* development of *in vitro* fertilized bovine embryos. *Mol. Reprod.*

MADURACION *IN VITRO* DE OVOCITOS BOVINOS

- Develop.*, 31: 72-77.
- Ryan, J.M. y P.H. Walk. 1979. TCA Manual, 5: 1043.
- Saeki, K., M.L. Leibfried-Rutledge and N.L. First. 1990. Are fetal calf serum and hormones necessary during *in vitro* maturation of cattle oocytes for subsequent development?. *Theriogenology*, 33: 316.
- Sanbuissho, A. and W.R. Threlfall. 1990. The influence of serum and gonadotropins on *in vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 34: 341-347.
- SAS institute Inc. 1982. SAS user's guide: Basic.
- Sato, E. and S.S. Koide. 1988. A factor from bovine granulosa cells preventing oocyte maturation. *Differentiation*, 39: 229-234.
- Shipman, C. 1969. The influence of Hepes on buffering of different cell lines culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 130: 305.
- Sirard, M.A., K. Coenen and S. Bilodeau. 1992. Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology*, 37: 39-55.
- Totey, S.M., S. Gurpreet, M. Taneja and G.P. Talwar. 1991. *In vitro* maturation and fertilization of follicular oocytes from buffalo. *Theriogenology*, 35: 284.
- Tsafiri, A., S.H. Pomerantz and C.P. Channing. 1976. Inhibitor of oocyte maturation by porcine follicular fluid; partial characterization of the inhibitor. *Biol. Reprod.*, 14: 511-516.
- Wales, R.G. 1970. Effects of ions on the development of the pre-implantation mouse embryo *in vitro*. *Aust. J. Biol. Sci.*, 23: 421-429.
- Willis, P., R.A. Fayrer-Hosken and A.B. Candle. 1990. Effect of serum on *in vitro* maturation of equine oocytes. *Theriogenology*, 33: 345.
- Zhang, L., E.G. Blakewood, R.S. Denniston and R.A. Godke. 1991. The effect of insulin on maturation and development of *in vitro* fertilized bovine oocytes. *Theriogenology*, 35: 301.
- Zheng, Y.S. and M.A. Sirard. 1992. The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes. *Theriogenology*, 37: 779-790.
- Zuelke, K.A. and B.G. Brackett. 1993. Increased glutamine metabolism in bovine cumulus cell-enclosed and denuded oocytes after *in vitro* maturation with luteinizing hormone. *Biol. Reprod.*, 48: 815-820.

Recibido: 26-6-95. Aceptado: 28-4-97.