

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MASTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA

Y

TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

Evaluación de Ovocitos Ovinos por Microscopia de Luz Polarizada



TRABAJO FIN DE MÁSTER
POR
Fernando Cuadrado Santiago.

JUNIO 2012

A mi madre por
estar siempre ahí.
Te quiero.

Contenido	Pág.
INDICE GENERAL.	I
INDICE DE FIGURAS.	II
ABREVIATURAS.	III
1. <u>INTRODUCCIÓN.</u>	1
1.1. <u>Maduración <i>in Vitro</i> de ovocitos de ovejas.</u>	1
1.1.1. Maduración del ovocito.	3
1.1.2. Conformación del huso meiótico.	5
1.1.3. Conformación de la zona pelúcida.	5
1.1.4. Duración y condiciones de cultivo.	6
1.1.5. Problemática actual.	7
1.2. <u>Calidad de los ovocitos y Métodos de evaluación.</u>	7
1.2.1. Características morfológicas relacionadas con la calidad ovocitaria.	7
1.2.2. Pruebas bioquímicas y test de viabilidad.	8
1.2.3. Métodos de valoración del huso meiótico.	9
1.2.4. Microscopía de luz polarizada.	10
1.3. <u>Ovocitos de Animales Prepúberes.</u>	11
2. <u>OBJETIVOS.</u>	13
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS.</u>	13
3.1. <u>Recolección de Ovocitos, Selección y Transporte.</u>	13
3.2. <u>Visualización del Huso mediante MLP.</u>	14
3.3. <u>Evaluación del Huso Meiótico por Inmunocitoquímica.</u>	15
3.4. <u>Evaluación Morfométrica.</u>	16
3.5. <u>Diseño Experimental.</u>	16
3.6. <u>Análisis Estadístico.</u>	17
4. <u>RESULTADOS.</u>	17
5. <u>DISCUSIÓN.</u>	19
6. <u>CONCLUSIONES.</u>	23
7. <u>REFERENCIAS.</u>	24
<u>ANEXO FOTOGRÁFICO</u>	33
<u>AGRADECIMIENTOS</u>	35

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
Fig. 1. Esquema del crecimiento del ovocito durante la foliculogénesis (Mermillod et al., 1999).	3
Fig. 2. Esquema del equipo de MLP con ópticas de cristal líquido controladas electrónicamente y de la técnica para visualizar y evaluar el huso meiótico y la zona pelúcida.	11
Fig. 3. Ovocito de oveja prepúber en metafase II observado con (A) microscopía convencional y (B) microscopía de luz polarizada. (A-B) Magnificación original X 200.	33
Fig. 4. Ovocito de oveja prepúber en MII mediante microscopía convencional, con medida de diámetro total, mediante el software Oosight. Magnificación original X 200.	33
Fig. 5. Ovocitos de ovejas prepúberes en metafase II tomada con microscopía de luz polarizada donde se observa (A y B) la birrefringencia de la zona pelúcida y medición de su valor de retardo medio (Mean Retardance) y (B) la determinación del valor de retardo medio del huso meiótico (Region d). (A-B) Magnificación original X 200.	34
Tabla	
Tabla 1. Componentes del medio de maduración.	14
Tabla 2. Índice de Retardo medio del huso meiótico con respecto a la conformación huso.	18
Tabla 3. Evaluación del índice de retardo de la zona pelúcida con respecto al diámetro total del ovocito	19
Tabla 4. Evaluación del índice de retardo de la Zona Pelúcida en relación a los estadios de maduración del ovocito.	19

ABREVIATURAS

- AMPc:** Adenosínmonofosfato cíclico.
- AMPc:** Adenosinmonofosfato cíclico.
- ANOVA:** Análisis de la varianza.
- BCB:** Blue Cresyl Brilliant.
- CE:** Cultivo de embriones.
- COC:** Complejo cúmulus-ovocito.
- D Citoplasma:** Diámetro citoplasma.
- D Total:** Diámetro total.
- D ZP:** Diámetro zona pelúcida.
- ERK:** Quinasas reguladoras de la señal extracelular.
- Esp. Perivitelino:** Espacio perivitelino.
- FDA:** Fluorocromo diacetato de fluoresceína.
- FIV:** Fecundación *in Vitro*.
- FSH:** Hormona folículo estimulante.
- G6PDH:** Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
- GV:** Vesícula germinal.
- GVBD:** Ruptura de la vesícula germinal.
- I.R HM:** Índice de retardo del huso meiótico.
- I.R ZP:** Índice de retardo de la zona pelúcida.
- LH:** Hormona luteinizante.
- MAPs:** Proteínas asociadas a los microtúbulos.
- MI:** Metafase I
- MII:** Metafase II.
- MIV:** Maduración *in Vitro*.
- MLP:** Microscopía de luz polarizada.
- MPF:** Factor promotor de la maduración.
- MTOC:** Centros de organización de microtúbulos.
- nm:** Nanómetros.
- PCM:** Material filamentoso pericentriolar.
- TRA:** Técnicas de reproducción asistida.
- ZP:** Zona pelúcida.

1. Introducción.

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) han tomado una gran importancia en el ámbito de la reproducción tanto humana como animal. Considerando que la mayoría de las técnicas usadas, están en un grado de especialización muy alta, una de las posibilidades de mejora podría ser la selección del material biológico con mejores características para ser usadas en ellas. Por esto en los últimos años se ha investigado y se ha comprobado la gran importancia de la calidad ovocitaria para poder estimar el desarrollo de los embriones. Es necesario encontrar métodos que nos permitan producir y seleccionar embriones con unas características superiores, implementar procesos de control de la calidad consiguiendo así mejores resultados en los porcentajes de implantación y preñeces llegadas a término (Gerris y Van Royen, 2000). La producción de embriones *in Vitro* está muy relacionado con la calidad de los ovocitos (Rizos et al., 2002), por lo que desarrollar una serie de técnicas que nos permitan seleccionar los mejores para su maduración/cultivo, es una de las líneas de investigación que están siguiendo los diversos grupos de investigación en este área. Durante años, la selección de los ovocitos dependía de métodos subjetivos o no subjetivos pero que eran invasivas, es decir que se necesitaba fijar los ovocitos para juzgar su calidad, con lo que se acababa con la posibilidad de utilizarlos posteriormente. Con el desarrollo de las técnicas no invasivas, como la microscopía de luz polarizada (MLP), se abre la posibilidad de seleccionar los mejores ovocitos y que se desarrollen después produciendo, teóricamente, mejores embriones.

Este trabajo estudia la posibilidad de utilizar la MLP para evaluar los ovocitos de ovejas prepúberes y su posible uso como indicador de la calidad y por lo tanto del potencial desarrollo embrionario.

1.1. Maduración *in Vitro* de ovocitos de oveja.

La maduración *in Vitro* (MIV) de ovocitos, es el proceso por el que un ovocito en estado de vesícula germinal realiza los cambios nucleares y citoplasmáticos necesarios para poder llegar a la expulsión del primer corpúsculo polar. La maduración es un proceso crucial en la producción de embriones *in Vitro*. La maduración de ovocitos está influenciada por los componentes de los medios así como las condiciones utilizadas para esta técnica. La MIV es uno de los principales factores que limitan la eficiencia de la producción de embriones *in Vitro*, ya que aún después de la selección

cuidadosa de una población homogénea de complejos cúmulo-ovocito (COC), sólo la tercera parte, alcanzan la maduración citoplásmica completa y poseen la capacidad de producir blastocistos viables para su transferencia, lo que ocasiona que ésta técnica de reproducción asistida sea menos eficiente, comparada con la producción de embriones *in vivo* (De Wit et al., 2000; Rizos et al., 2002); probablemente debido a la incapacidad del medio de cultivo utilizado durante la MIV para reproducir las complejas señales y comunicación entre los ovocitos y las células somáticas circundantes, que ocurren de manera natural dentro del folículo ovulatorio (Eppig et al., 1996), afectando la tasa de fertilización *in Vitro* y su desarrollo embrionario (Cognié et al., 2003; Korhonen et al., 2005). Los medios comerciales comúnmente utilizados para la MIV, tal como el TCM-199 suplementado con suero de origen animal, han obtenido resultados aceptables; sin embargo, para algunos autores, el uso de tales medios presenta algunos inconvenientes como una gestación prolongada y un mayor peso al nacimiento en ovinos, representando además, una potencial vía de introducción de agentes patógenos o toxinas (Thompson, 2000).

Hay que tener en cuenta que la maduración del ovocito en el folículo está condicionada por la presencia de hormonas: FSH, LH y estradiol. Por esta razón en la maduración *in Vitro* se necesita que los medios de cultivo se parezcan lo más posible a las condiciones *in vivo* y por ello actualmente se enriquecen con dichas hormonas (Moor y Trounson, 1977). Sin embargo, la adicción de estas hormonas es todavía controvertida, ya que algunos estudios no encuentran diferencias significativas en los ovocitos que alcanzan la metafase II (MII) o la formación de blastocistos en presencia o ausencia de hormonas exógenas gonadotrópicas (O'Brien et al., 1996). Mientras que otros estudios indican que la adicción de hormonas exógenas gonadotróficas incrementa el número de ovocitos que alcanzan la MII, la viabilidad de los embriones (Galli y Moor, 1991) y aseguran que la adicción de gonadotropinas es esencial para la maduración de ovocitos de corderas (Ledda et al., 1997).

Otro de los problemas que se han descrito durante la MIV es el endurecimiento de la zona pelúcida produciendo una disminución en la tasa de fertilidad. Para evitar esto se añade al medio de maduración entre un 1-5% de suero (Downs et al., 1986).

1.1.1. Maduración del ovocito

Durante la maduración del ovocito, se producen una compleja serie de modificaciones en el citoplasma, junto con la maduración meiótica del núcleo y ciertos cambios en la membrana, con el fin de preparar a este ovocito para ser fecundado con éxito y poder mantener la primera fase de desarrollo embrionario. En la Fig. 1 se representan las diferentes fases del crecimiento, capacitación y maduración durante la foliculogénesis del ovocito según Mermillod et al., (1999).

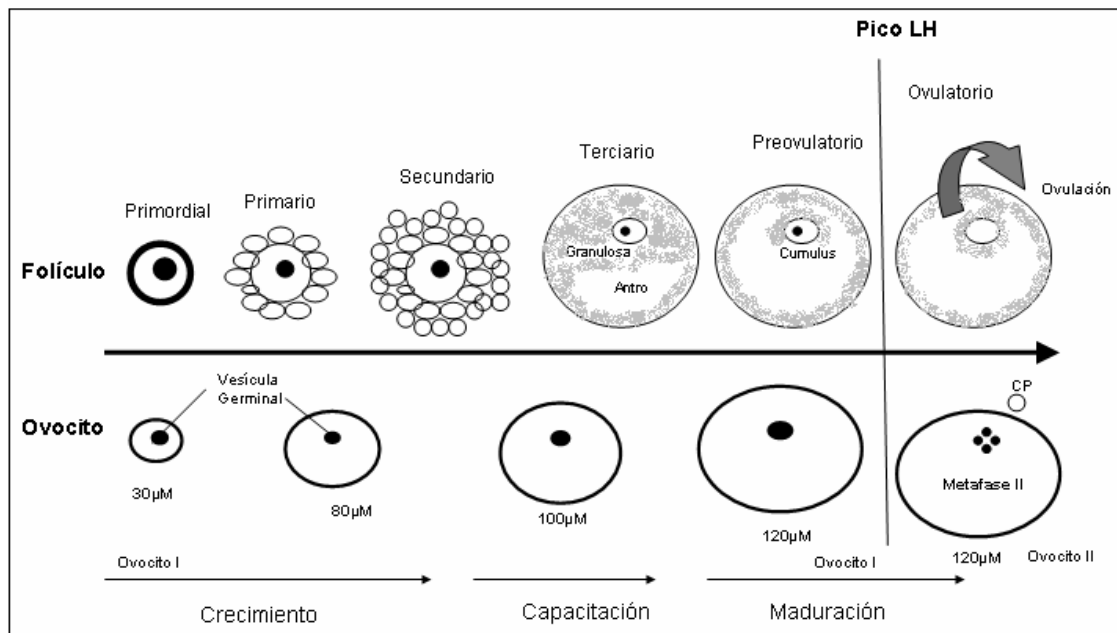


Fig. 1. Esquema del crecimiento del ovocito durante la foliculogénesis (Mermillod et al., 1999). Esta maduración se divide en citoplasmática y maduración nuclear:

A) Maduración citoplasmática

Los cambios que acontecen en el paso de ovocito primordial hasta embrión transcripcionalmente activo se pueden dividir en:

- **Capacitación ovocitaria**, que es el proceso de preparación del ovocito durante la foliculogénesis que posibilita un desarrollo embrionario posterior (Hyttel et al., 1997; Moor et al., 1998). En este periodo sólo se dividen las células somáticas, no el ovocito. Representa un período de síntesis intensa y almacenamiento de macromoléculas.
- **Modificaciones bioquímicas y morfológicas** del ovocito durante la maduración son desencadenadas por el pico de LH. La maduración ovocitaria está desencadenada por la respuesta folicular al pico preovulatorio de gonadotropinas, que confiere al ovocito la capacidad de sostener la fecundación

y el desarrollo embrionario temprano. Durante esta fase de maduración, las células de la granulosa siguen produciendo esteroides, pero tiene lugar el paso de un ambiente estrogénico a otro donde predomina la progesterona. Por otra parte, producen ácido hialurónico que permite la expansión y mucificación de las células del cúmulus y pérdida de las uniones tipo *gap* de contacto entre el ovocito y estas células. El potencial para la maduración nuclear y citoplasmática se adquiere conjuntamente durante el desarrollo del ovocito (Moor et al., 1998; Picton et al., 1998).

B) Maduración Nuclear

Los ovocitos de la mayoría de mamíferos se encuentran en estadio de diplotene de la profase I, hasta que se produce la adecuada estimulación de factores de crecimiento y hormonales dando lugar a la progresión de estos ovocitos al estadio de MII. Posteriormente, éstos quedarán en este estadio de MII hasta que se produzca la fecundación.

- **Adquisición de la competencia meiótica;** la adquisición de la capacidad meiótica está asociada con la aparición de componentes esenciales del ciclo celular como el factor promotor de la maduración (MPF) (Masui y Market 1971), una quinasa que se activa en ovocitos completamente desarrollados entre las 8 y 12h después de la inducción de la maduración.
- **Reanudación de la meiosis;** Se han estudiado diversas moléculas que regulan el proceso meiótico, como:
 - Adenosínmonofosfato cíclico (AMPc)
 - Factores promotores de la maduración (MPF)
 - Quinasas reguladoras de la señal extracelular (ERK)

La maduración meiótica del ovocito conlleva la capacidad para la rotura de la membrana nuclear, y posterior progresión hasta MII.

Resumiendo, la reanudación de la meiosis puede explicarse mediante una reducción en la concentración de AMPc y la consiguiente activación-inactivación de proteínas presentes en el ooplasma (Fulka et al., 1998; Moor et al., 1998; Picton et al., 1998).

Durante esta fase se pasa de la presencia de cromatina dispersa en un primer momento a diferentes estadios de condensación de ésta, hasta formar una red de bivalentes individuales, la desaparición del nucleolo y la rotura de la vesícula germinal (GVBD).

1.1.2. Conformación del huso meiótico.

La mayoría de nuestro conocimiento de la estructura del huso se ha obtenido del análisis de muestras teñidas mediante inmunocitoquímica y microscopía confocal tras la tinción de la tubulina y la cromatina ó mediante microscopía electrónica. Estas técnicas nos proporcionan imágenes estáticas, que no nos permiten estudiar el comportamiento dinámico del huso en cada ovocito.

La importancia del buen mantenimiento de la estructura del ovocito radica en el hecho de que en la meiosis debe ocurrir una correcta separación de las cromátidas hacia los polos durante la anafase, lo que se conoce como disyunción meiótica; cuando esto no ocurre o hay un retraso en la primera o segunda división meiótica, sobrevienen problemas en la configuración de los cromosomas, alterando el número correcto de éstos, es decir, dejan de ser múltiplos básicos del número haploide original de la especie, lo que se conoce como aneuploidía. Por esto es importante conocer la estructura tanto del huso meiótico.

Durante la obtención de ovocitos por punción de ovarios de matadero los ovocitos inmaduros extraídos de los folículos aparecen como un complejo ovocito-cúmulus en etapa de vesícula germinal (GV). Tras la maduración se llega a la MII y se produce la extrusión del primer corpúsculo polar.

El huso meiótico es una estructura temporal y dinámica formada por microtúbulos. Los microtúbulos estructuralmente son tubos huecos cilíndricos con un diámetro de 25 nanómetros (nm) y longitud variable de 25-200 micras. Los microtúbulos, están constituidos por la unión de unidades heterodiméricas de α y β tubulina compuestos por 13 protofilamentos unidos formando un cilindro. Las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs) regulan la unión de los microtúbulos y participan en la interacción con otros componentes celulares. La tubulina polimerizada está en equilibrio con la reserva de tubulina libre en el ooplasma. Los microtúbulos son muy sensibles a cualquier cambio físico o fisiológico que puede producir la despolimerización de la tubulina y desestructuración microtubular.

1.1.3. Conformación de la zona pelúcida.

La zona pelúcida (ZP) de la oveja no ha sido muy estudiada. En mamíferos, la ZP es una matriz extracelular, que rodea al ovocito y al embrión antes de su implantación. Forma una capa que mantiene la separación del oolema de la región

interna del folículo, la corona radiata crea prolongaciones celulares que atraviesan la ZP y forman con la membrana plasmática del ovocito los puentes celulares o gap junction. La ZP tiene gran importancia durante el proceso de fecundación, estableciendo el contacto especie-específico de las células espermáticas, la unión de los espermatozoides capacitados y la inducción de la reacción acrosómica (Florman y Storey, 1982). La ZP en mamíferos se compone de tres o cuatro familias de glicoproteínas que forma una estructura tridimensional compleja, son el producto de familias de genes llamadas ZP1, ZPA, ZPC y ZPB, que codifican proteínas que se designan ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4. Estas proteínas están altamente glicosiladas y presentan un peso molecular muy similar (Noguchi et al., 1993; Bauskin et al., 1999). La ZP está formada por un entramado fibrilar, constituidos por dímeros de las glicoproteínas ZP1:ZP3 y ZP2:ZP3. En la mayoría de las especies la ZP es secretada por el ovocito en capas, la capa externa presenta numerosos poros mientras que la interna presenta una apariencia regular y rugosa (Phillips y Shalgi, 1980; Keefe et al., 1997).

1.1.4. Duración y condiciones de maduración-cultivo.

El tiempo de cultivo necesario para obtener ovocitos madurados *in Vitro* en el estadio nuclear de MII es bastante aproximado al requerido *in vivo*. La duración del cultivo durante la MIV de los ovocitos ovinos es de entre 24 y 27 horas. Recientemente, otros autores apuntan a la necesidad de reducir los tiempos de maduración para conseguir una mejor calidad ovocitaria, ya que se ha observado que los ovocitos más viejos tienen menor capacidad de ser fecundados que los jóvenes, debido a la menor cantidad de quinasa H1 y a la menor cantidad de la forma activada del MPF (Kikuchi et al., 2000).

Las condiciones físicas específicas del ambiente en el que maduran los ovocitos (osmolaridad, pH y composición iónica del medio, temperatura y tensión de CO₂ y O₂ del incubador, volumen de cultivo y tiempo de incubación), así como la mayor o menor definición del medio de maduración utilizado (suero, células somáticas, etc.) van a influir en el resultado final (Holm y Callesen, 1998). La temperatura de incubación más utilizada, tanto en la MIV como en la fecundación *in Vitro* (FIV) y el cultivo de embriones (CE) se encuentra cercana a la temperatura corporal de la oveja que es de 38.5°C. La atmósfera de cultivo empleada como rutina en los protocolos de producción de embriones ovinos es de 5% de CO₂.

1.1.5. Problemática actual.

El mayor problema con el que nos encontramos es que los ovocitos madurados *in Vitro* presentan una capacidad de desarrollo inferior a los madurados *in vivo* (Rodríguez y Farin, 2004). Las condiciones en las que se produce la maduración *in Vitro* podría ser el causante de esta menor tasa de maduración. Una incompleta maduración citoplasmática puede dar lugar a fallos durante la fecundación incluyendo la polispermia y una asincronía en la formación pronuclear (Mattioli et al., 1988; Moor et al., 1990) que se conocen como uno de los principales problemas de la baja capacidad de desarrollo de los ovocitos madurados y fecundados *in Vitro* (Hunter, 1991). La problemática de la bajada de la tasa de maduración, ha llevado a la búsqueda de indicadores que nos permitan seleccionar ovocitos que tengan una tasa de desarrollo mejor, con lo que a la larga mejoraríamos nuestra producción de embriones.

1.2. Calidad de ovocitos y Métodos de Valoración de la Calidad.

1.2.1. Características morfológicas de un ovocito de calidad.

Durante mucho tiempo se ha intentado relacionar la morfología del ovocito con el potencial de desarrollo del futuro embrión por ello es tan importante dar unos parámetros definidos respecto a lo que se considera un ovocito con una buena morfología y por lo tanto con una buena calidad. De forma general se considera un ovocito maduro de buena calidad a aquel que presenta una forma esférica, con una zona pelúcida regular, un corpúsculo polar intacto y con un citoplasma homogéneo y sin inclusiones. Así mismo presentará una buena expansión de las células del cúmulus y células de la corona radiata.

Según estas características podríamos dividir los ovocitos según su calidad en:

- **Grado A ó excelentes:** COC'S con citoplasma granular homogéneo, y con 4 o más capas de células del cúmulus.
- **Grado B ó buenos:** COC'S con citoplasma granular homogéneo y con 2-3 capas de células del cúmulus.
- **Grado C ó regulares-malos:** ovocitos parcial o totalmente denudados o con las células del cúmulus expandidas y con el citoplasma no homogéneo y oscurecido.

Eckert and Niemann (1995) demostraron que no se encuentran diferencias en el potencial desarrollo entre los ovocitos de tipo A y B, por lo que en nuestro estudio los clasificaremos en excelentes-buenos y regulares-malos.

Según De Santis (2007), la selección de ovocitos con las mejores características morfológicas no aseguran la llegada a buen término de los embarazo por lo que se deberán de buscar parámetros más fiables.

1.2.2. Pruebas bioquímicas y test de viabilidad.

Estas técnicas mediante tinción tratan de seleccionar los ovocitos con un mayor potencial para desarrollarse y producir embriones de mejor calidad.

- **Fluorocromo diacetato de fluoresceína (FDA):** se basa en la integridad de la membrana para indicar la viabilidad del ovocito, debido a la permisividad de esta a la entrada de este fluorocromo. Los ovocitos se observan mediante un microscopio de fluorescencia, los vivos presentan una fluorescencia verde mientras que los muertos no la presentan. Esta tinción se puede combinar con la tinción con Tripán Blue, que tiñe los ovocitos muertos con un color azul que se ve mediante microscopía convencional.
- **Glicólisis:** Este test estudia el consumo de glucosa, la producción de metabolitos (lactato y piruvato) por parte del ovocito y la relación entre ellos, observándose que cuanto mayor es el estado de maduración del ovocito mayor es el consumo de glucosa, la producción de metabolitos se mantiene constante, con lo que disminuye la relación glucosa:lactato (Sutton et al., 2004). La ruta glicolítica del COC permite la producción de ATP y de metabolitos como el lactato y piruvato que pueden ser utilizado por el ovocito (Downs y Utecht, 1999; Harris et al., 2007, 2009). Esta actividad glicolítica está relacionada con el desarrollo del ovocito (Krisher y Bavister, 1999; Spindler et al., 2000; Durkin et al., 2001; Herrick et al., 2006).
- **Test Brilliant Cresyl Blue (BCB):** determina la actividad intracelular de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), que es una de las enzimas de la vía pentosa fosfato, que va disminuyendo según el ovocito llega a fases más maduras de su crecimiento. Pudiendo ser BCB+ si el citoplasma presenta un color azulado, que indica una baja actividad de la G6PDH que no puede degradar el BCB y por lo tanto que ha finalizado su fase de crecimiento. En el BCB- se observa el citoplasma sin

teñir, lo que indica una alta capacidad de la G6PDH que degrada el BCB y por lo tanto es un ovocito en crecimiento.

- **Análisis de la actividad de las caspasa 3** o el patrón de expresión de los genes relacionados con la apoptosis (familia BCL2) como marcador de atresia. Varios estudios han investigado la apoptosis de las células foliculares como un marcador potencial para la calidad ovocitaria, pero los resultados conseguidos han sido contradictorios. En este test se debe evaluar la actividad de caspasa 3 como marcador de apoptosis temprana y Tunel para la apoptosis tardía, seguido de un análisis genético (Alm et al., 2000 ; Feranil et al., 2005 ; Boone et al., 1998 ; Fenwich et al., 2001; Nicholas et al., 2005).

1.2.3. Métodos de valoración del huso meiótico.

Debido a que durante la meiosis la sujeción y segregación de los cromosomas dependen de los microtúbulos, poder detectar y evaluar el huso meiótico por varios métodos tiene gran importancia (Wang y Keefe, 2002).

Estos métodos se pueden dividir en aquellos que son invasivos y por lo tanto acaban con la viabilidad de los ovocitos y los no invasivos.

- **Técnicas no invasivas:**
 1. **Microscopía de contraste de fase:** permite observar el huso meiótico sin fijar el ovocito. Sin embargo es difícil conseguir una buena imagen en animales domésticos.
 2. **Microscopía de luz polarizada:** se puede detectar y evaluar el huso meiótico siendo esta técnica totalmente no invasiva y manteniendo intacta la viabilidad del ovocito. Esta técnica permite la evaluación del huso meiótico a tiempo real, lo que permitiría el estudio de la dinámica de formación y cambios del huso meiótico.
- **Técnicas invasivas:**
 1. **Tinción con Orceina y lacmoid:** usadas para evaluar la maduración del ovocito desde vesícula germinal a metafase II. En las dos se necesita fijar el ovocito por lo que pierde su viabilidad.
 2. **Fluorescencia y microscopia confocal:** mediante inmunohistoquímica y microscopía confocal se obtienen imágenes estáticas. (Mandelbaum et al., 2004)
 3. **Microscopía electrónica:** utiliza electrones para formar imágenes de muestras

de tamaño muy reducido, para ello las muestras deben de estar fijadas mediante técnicas químicas o resinas.

1.2.4. Microscopía de luz polarizada.

La microscopía de luz polarizada tiene la habilidad de medir moléculas submicroscópicas de células vivas de forma no destructiva y dinámica. El alineamiento de las uniones moleculares o de las partículas submicroscópicas altera el paso de la luz polarizada produciendo la birrefringencia (Oldenbourg, 1995).

La birrefringencia es una propiedad óptica que se produce cuando la luz pasa a través de una estructura anisotrópica, causando que el haz de luz se divida en dos rayos que viajan a diferente velocidad. Las estructuras anisotrópicas tienen dos índices de refracción diferentes dividido en dos ejes, uno rápido y otro lento, mientras que las isotrópicas tienen un índice de refracción homogéneo en todas las direcciones cuando pasan por la estructura. El índice de retardo es una medida que nos indica en que grado la velocidad del haz de luz se reduce o retarda cuando se propaga por un medio.

El retardo se mide en unidades de longitud, en este caso se usa el nanómetro (nm), y se interpreta como la relación entre la organización macro y micro molecular y la densidad estructural. Un valor alto en el retardo significa una fuerte densidad estructural y un buen alineamiento de las estructuras y un valor bajo será sinónimo de debilidad estructural, baja densidad y mal alineamiento. Esta propiedad nos da una oportunidad para evaluar las estructuras de muestras biofísicas sin tener que utilizar tinciones que obligaban a fijar la muestra.

El huso meiótico y la zona pelúcida son estructuras birrefringentes, y por lo tanto presentarán esta propiedad. La posibilidad de visualizar el huso meiótico de una forma no invasiva y por tanto manteniendo su viabilidad, basándose en la birrefringencia, es importante ya que la presencia o ausencia del huso tiene una importancia crítica para la fertilización y desarrollo del embrión (Coticchio et al., 2004; Raju et al., 2007; Wang y Keefe, 2002). Se ha indicado que la ausencia de respuesta positiva y por lo tanto de ausencia del huso se relaciona con una pobre fertilización y desarrollo. Un valor en la señal de birrefringencia bajo podría indicar una anomalía en el huso meiótico. Liu et al., (2002) estableció que los husos de ovocitos de ratón de mayor edad presentan una disminución en la birrefringencia y una forma anormal.

Esta técnica también puede ser usada para observar la zona pelúcida, cuya organización juega un papel vital en el desarrollo y fertilización. Mediante la birrefringencia se puede observar la densidad, orientación y grosor de la zona, que se ha presentado como un indicador importante del estado del ovocito (Shen, 2005; Pelletier, 2004).

El equipo de MLP utiliza luz polarizada y un par de moduladores electro-ópticos cuyos ejes están rotados 90° uno del otro. Una cámara de video y un analizador de imágenes asistido por ordenador permiten la medición rápida y simultánea de la anisotropía de la muestra en todos los puntos de la imagen del campo de visión (Fig. 2).

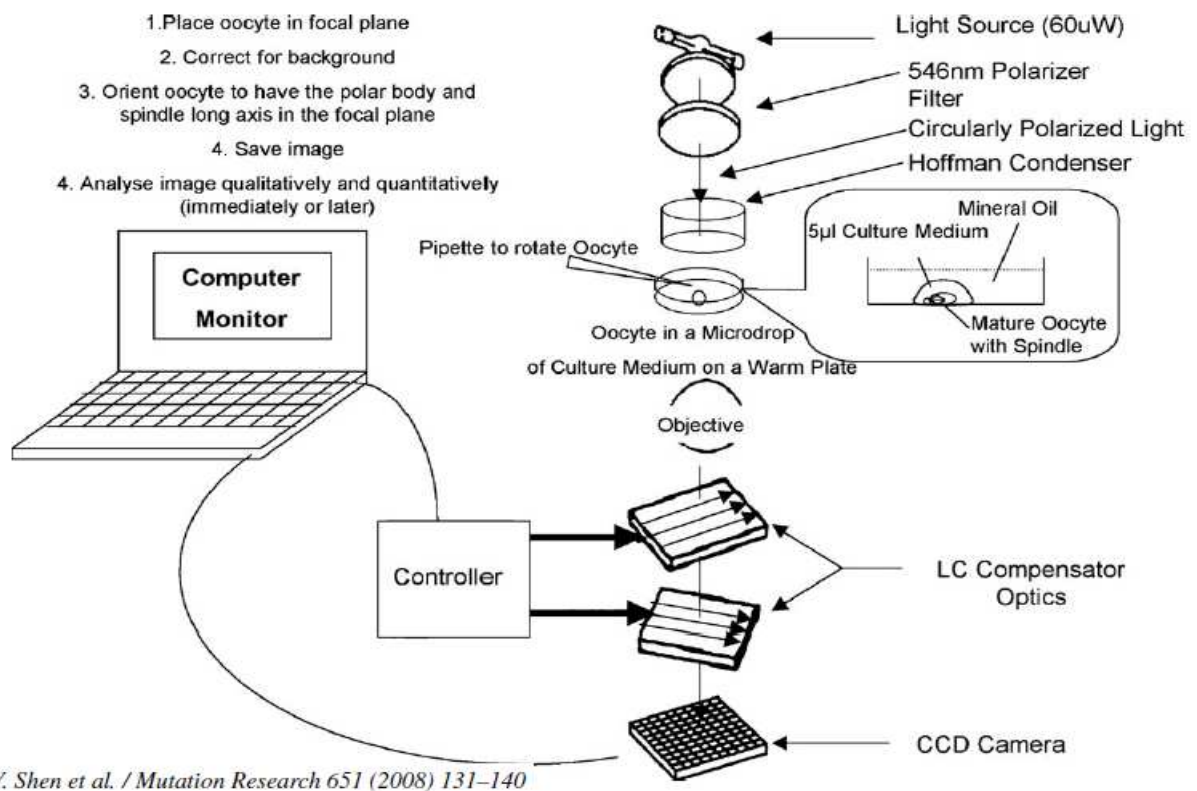


Fig. 2. Esquema del equipo de MLP con ópticas de cristal líquido controladas electrónicamente y de la técnica para visualizar y evaluar el huso meiótico y la zona pelúcida.

1.3. Ovocitos de Animales Prepúberes

Los ovocitos de oveja (O'Brien et al., 1996), vacas (Revel et al., 1995), y cerdos (Peters et al., 2001) prepúberes tienen una eficiencia menor en las técnicas *in Vitro*, que se caracterizan por tener una maduración citoplasmática anormal y una menor habilidad para llegar al estado de blastocistos. (Amstrong, 2000)

Se han publicado estudios que demuestran que los blastocistos de animales prepúberes o provenientes de ovocitos de folículos con un tamaño pequeño tienen una viabilidad menor que los de animales adultos o de folículos con un mayor tamaño que se

demuestra en un retraso en la formación del blastocisto (Majerus et al., 2000), un número menor de células en la partenogénesis (Bagg et al., 2007) o una menor reexpansión en la descongelación (Leoni et al., 2006-2009). Los ovarios de animales prepúberes presentan un alto porcentaje de folículos antrales con un diámetro menor de 3mm, haciendo difícil la aspiración de COC'S por aspiración tradicional, por esto los ovocitos de animales prepúberes se obtienen rutinariamente mediante la técnica llamada slicing de la superficie ovárica, siendo estos ovocitos de diámetros heterogéneos, COC'S con una morfología variable y en diferentes estados de atresia (Martino et al., 1994). En cabras prepúberes los ovocitos con un diámetro mayor de 125 µm producen un mayor porcentajes de blastocistos tras fecundación *in Vitro* (FIV) (Anguita et al., 2007) e ICSI (Jiménez-Macedo et al., 2007).

Asimismo se han observado alteraciones en las características normales en la estructura y la funcionalidad de ovocitos de cabras prepuberales como alteraciones en la distribución de gránulos corticales (Velilla et al., 2004) y mitocondrias (Velilla et al., 2006), desestructuración de los microtúbulos y microfilamentos (Velilla et al., 2005) y alteraciones del contenido total del ARN, p34(cdc2) y en la expresión de ciclina B1 y la actividad de MPF(Anguita et al., 2007-2008). También se ha reportado un aumento en la activación partenogénica y una polispermia en ovocitos de oveja comparado con los de otros animales adultos.(Ledda et al., 1997; Laemmli et al., 1970). Todas estas anomalías pueden causarse por el menor tamaño del folículo o la edad del animal donante que producen una deficiente maduración del ovocito.

2. OBJETIVOS.

El objetivo de este trabajo es evaluar la eficiencia de la microscopia de luz polarizada (MLP) como métodos no invasivo para la evaluación de ovocitos prepúberes de ovino y su posible uso como indicador de la calidad de los mismos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Recolección de Ovocitos, Selección y Transporte.

Los ovarios se obtuvieron de ovejas prepuberales (2 meses) de un matadero de Barcelona y se transportan al laboratorio de la Universidad Autónoma de Barcelona en PBS a una temperatura de 38°C. Se lavaron en un medio de PBS con antibiótico y antimicótico (AB, Gibco cat 14240-062). Debido al pequeño tamaño de los folículos los COC'S se recuperaron mediante corte de la superficie del ovario (slicing) en medio TCM-199 con 0,5 g/L de BSA. Bajo lupa estereoscópica los ovocitos que presentaban dos o más capas de células del cúmulus y un citoplasma homogéneo se seleccionaron para su uso en el experimento. Para el transporte de los ovocitos desde Barcelona al laboratorio de embriología del Serida, en Deva, los ovocitos (N=30-40) se colocaron en un tubo Corning de 2 ml con referencia 430659 (criotubo) en un incubador portátil Minitube, en el cual se llevó a cabo parte de la maduración. Esta forma de transporte no afecta ni a la conservación ni desarrollo de los ovocitos en comparación con las placas de uso tradicional (Thompson 2007). Los tubos en el que los ovocitos son transportados, contienen el medio de maduración con osmolaridad 269-290 mOsm.

Los componentes del medio de maduración se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1. Componentes del medio de maduración.

	Referencia	Concentración final	15 ml (sol. Stock)
TCM 199	M-4530 Sigma		Enrasar a 15 ml
FSH	F-8174 Sigma	5µg/ml	50µl (1.5mg/ml)
LH	L-5269 Sigma	5µg/ml	41.89(1.79mg/ml)
Estrógenos	E-2257 Sigma	1µg/ml	150µl (0.1mg/ml)
EGF	E-4127 Sigma	10ng/ml	75µl (0.002mg/ml)
SFB	F-9665 Sigma	10%	1.5ml
ATB	15240-062 15240-062 Gibco	1%	150µl
Cyst	M-9768 Sigma	100µM	150µl
Glutamina		2mM	150µl
Piruvato de Na	P-4562	0.2mM	33µl (10mg/ml)

A la llegada a Deva, se extrajo el tubo del incubador portátil y se colocó dentro de un incubador del laboratorio con la tapa abierta a 38°C y a 5% de CO₂ hasta completar las 27 horas de maduración, contando el tiempo empleado en el transporte. Luego, en la campana de flujo laminar y con la ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio y chupete, se pasa el medio conteniendo los ovocitos a una placa de Petri con medio 199-Hepes.

3.2. Visualización del Huso mediante MLP.

Tras el proceso de MIV (27 h), se procedió a denudar los ovocitos para eliminar las células del cúmulus, mediante el uso de hialuronidasa. Se introdujeron los ovocitos en medio con Hepes-199 con 300 IU/ml de hialuronidasa, se incubaron a 38.5°C durante 2 minutos y después se realiza el vórtex durante otros 2 minutos. Con este proceso se eliminaron las células del cúmulus. Los ovocitos se pasaron a un placa de Petri

conteniendo medio TCM199-Hepes-FCS, tras lo cual se colocaron individualmente en microgotas de 10 μ l de TCM199-Hepes-FCS (25 mM Hepes y 10% suero fetal bovino) en placas de Petri con fondo de cristal, y estas microgotas se cubrieron con aceite mineral. Se utilizó un microscopio invertido (Olympus IX71, Japan) a 200x aumentos con el software Oosight system (CRI, Woburn, MA, USA) que consta de un filtro óptico móvil de cristal líquido, otro circular verde polarizador y una cámara científica grado CCD, con todo esto podremos trabajar y realizar fotos tanto convencionales como capaces de detectar la birrefringencia del huso meiótico si es que está presente y de la zona pelúcida. También se realizó las mediciones morfométricas de los ovocitos.

Durante toda la observación los ovocitos se mantienen a 38°C manteniéndolo en una pletina calefactable (Thermoplate-Tokai Hit, Japan). Para la manipulación de los ovocitos se utilizaron dos micromanipuladores (Ependorf, Germany) y micropipetas que fueron necesarias para sujetar y girar los ovocitos para asegurarnos de la presencia o no del huso. En el caso de estar presente se verá una luminiscencia blanca que se considera como una señal positiva. Si obtenemos una señal positiva, el software nos calculará automáticamente previa selección del área a evaluar, el índice de retardo del huso meiótico (I.R HM) (Fig. 3. ver anexo fotográfico). Además, también es capaz de medir en forma automática y directa el índice de retardo de la zona pelúcida (I.R ZP).

3.3. Evaluación del Huso Meiótico por Inmunocitoquímica.

Los ovocitos se fijaron en una solución de PBS con 4% de formaldehído, permeabilizado usando Triton X-100 al 2,5% durante 15 minutos y al mismo tiempo se realizó una tinción para detectar la α -tubulina y la cromatina (Morató et al., 2008).

La fijación y las incubaciones se harán a 37°C, para la tinción, los ovocitos fijados se incuban con el anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina (isotipo IgG1 de ratón) durante 90 minutos, seguida de una incubación con anticuerpo de cabra IgG-Alexa Fluor 488 durante 1 hora. Entre incubación e incubación, los ovocitos fueron lavados tres veces en PBS durante 5 minutos. Los ovocitos se montaron en portas y se tiñen con Vectashield medio para fluorescencia con DAPI. Como control negativo para α -tubulina se utilizó sólo el anticuerpo secundario. Se utilizó un microscopio confocal láser (Leica TCS-SP2-AOBS) para observar la tubulina (Alexa Fluor 488; 488 nm) y la cromatina (DAPI; 405 nm).

La morfología del huso y de los cromosomas se clasificaron en tres categorías:

1. **Huso normal:** forma típica de barril con cromosomas agregados en la placa metafásica y los microtúbulos cruzando el huso de polo a polo.
2. **Huso anormal:** microtúbulos con una conformación atípica, con cromosomas desagregados o desplazados de la placa metafásica.
3. **Ausencia de huso:** no se observan microtúbulos alrededor de los cromosomas.

3.4. Evaluación Morfométrica.

Para realizar la evaluaciones morfométricas se utilizó un microscopio invertido (Olympus IX71, Japan) a 200x aumentos con el software Oosight system (CRI, Woburn, MA, USA). que permite las mediciones. Para mantener un criterio unificado en todas nuestras mediciones se tomó como referencia el corpúsculo polar, realizando todas las mediciones paralelas a este, como se muestra en la Fig. 4. (ver anexo fotográfico).

Estas medidas son:

- **Diámetro total (D total):** realizamos la medición de la longitud total del ovocito incluyendo la zona pelúcida.
- **Diámetro Citoplasma (D citoplasma):** utilizando la medición anterior, como referencia, medimos la longitud del citoplasma sin tomar en cuenta la zona pelúcida.
- **Diámetro Zona Pelúcida (D ZP):** medición desde la capa externa a la capa interna de la zona pelúcida.
- **Espacio Perivitelino (Esp. Perivitelino):** diferencia de los datos obtenidos anteriormente $D_{total} - D_{citoplasma} - D_{ZP}$.

3.5. Diseño Experimental.

Los ovocitos fueron evaluados por microscopía de luz polarizada para detectar la presencia de proteínas polimerizadas de los microtúbulos que podrían estar formando un huso meiótico. La presencia de estas proteínas y del huso se confirmó mediante inmunocitoquímica. La señal positiva a la MLP del huso meiótico se estudió con el software Oosight para obtener el valor de retardo como posible indicador de la densidad y conformación de los microtúbulos.

También se evaluó la capacidad del software del sistema Oosight para establecer en forma automática el área de medición de la birrefringencia de la zona pelúcida y para determinar el valor de retardo de la misma. Por ultimo, se realizaron mediciones

morfométricas de cada ovocito. El experimento consta de cuatro replicas.

3.6. Análisis Estadístico.

Los valores de retardo de los husos meióticos con diferente conformación y de las zonas pelúcida provenientes de ovocitos con diámetros y estadios de maduración diferentes, se analizaron mediante ANOVA usando el procedimiento GLM del SAS. Se consideró que la ANOVA tiene significancia estadística, cuando $P < 0.05$. El análisis de correlación se realizó mediante el procedimiento Proc Corr del SAS y las variables analizadas fueron: señal MLP, presencia de proteína polimerizada, la morfología del huso meiótico mediante inmunocitoquímica, valores de las medidas morfométricas, valores de retardo tanto del huso meiótico como de la zona pelúcida.

4. RESULTADOS.

Se evaluaron un total de 62 ovocitos procedentes de cuatro replicas, encontrando una señal positiva a MLP en el 82% de ellos (52/62). De los ovocitos madurados *in Vitro* y expuestos a MLP, se obtienen valores de retardo de entre 2.14 y 9.05 nm.

De todos los ovocitos puestos a madurar, un 60% llegó a MII, a MI el 14%, a activados y a GV el 8%, respectivamente. De todos los ovocitos que se desarrollan hasta MII el 89% presentaban una señal positiva a la MLP (33/37) y se encontró una alta correlación positiva entre la respuesta de la microscopía de luz polarizada y la presencia de proteínas de los microtúbulos detectada por inmunocitoquímica ($r=0.94425$; $p < 0.001$). Esta correlación indica que hay una relación entre la señal de MLP y la presencia de proteínas polimerizadas del huso meiótico. Asimismo de los ovocitos en MII un 76% (28/37) presentan un huso normal y un 14% (5/37) uno anormal observado mediante inmunocitoquímica.

Para saber si se podría utilizar la MLP para evaluar la conformación del huso meiótico, se evaluó el índice de retardo medio de los husos meióticos considerando la conformación de los mismos determinada por inmunocitoquímica. Los resultados se presentan en la Tabla 2. No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los ovocitos con un huso meiótico con una conformación normal comparado con los que tenían una conformación anormal ($P > 0.4089$).

Tabla 2. Índice de Retardo medio del huso meiótico con respecto a la conformación huso.

Conformación del Huso Meiótico	IRHM
	X ± SEM
Normal	4.42±0.26
Anormal	3.92±0.54

IRHM: Índice de retardo del huso meiótico medido en nm.

Se realizaron mediciones morfométricas de los ovocitos, encontrando un valor de diámetro total del ovocito máximo de 174.65 micras, uno mínimo de 131.79 μm y una media de 148.79 μm . El diámetro citoplasmático presenta valores entre 102.14 μm y 139.32 μm . La ZP presenta un diámetro que se establece entre 7.70 μm y 19.85 μm . Se calculó también el espacio perivitelino, encontrando valores entre 11.56 μm y 38.24 μm .

Con respecto a las mediciones realizadas en zona pelúcida, se logró determinar que el software del sistema Oosight sólo pudo establecer en forma automática el área de medición de la birrefringencia de la zona pelúcida (Fig. 5. ver anexo fotográfico) en un número reducido de las ovocitos evaluados (N=22). Trabajando con esta muestra reducida y con las limitaciones que esto implica para realizar los análisis estadísticos, se encontró una correlación positiva entre la detección de la birrefringencia (medida como valor de retardo) de la zona pelúcida y el diámetro total del ovocito ($r=0.77252$; $p<0.0001$). A la vista de los resultados anteriores, estudiamos la posibilidad de la existencia de una relación entre el I.R ZP y el diámetro total del ovocito, dividiendo los ovocitos estudiados en dos grupos:

- **Grupo 1:** Los de un diámetro menor que el valor medio del diámetro de nuestra muestra (<148.79 μm).
- **Grupo 2:** Los de un diámetro mayor que el valor medio del diámetro de nuestra muestra (>148.79 μm).

Los resultados se presentan en la Tabla. 3 y demuestran que existe una diferencia estadística significativa ($P<0.05$), entre el I.R ZP de los diámetros considerados, siendo el grupo 2, es decir los ovocitos de diámetro total mayor de la media, los que tuvieron un mayor I.R ZP que los del grupo 1 (diámetro total menor que la media).

Tabla 3. Evaluación del índice de retardo de la zona pelúcida con respecto al diámetro total del ovocito

Diámetro total (μm)	IRZP $X \pm \text{SEM}$
<148.79	6.23\pm 0.61^a
>148.79	8.01\pm0.53^b

^{a, b} indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

IRZP: Índice de retardo del huso meiótico medido en nm.

Como se puede observar en la Tabla 4 no se encontraron diferencias significativas entre los estadios de maduración de los ovocitos y los valores de I.R ZP.

Tabla 4. Evaluación del índice de retardo de la zona pelúcida en relación a los estadios de maduración del ovocito.

Estadio del ovocito	IRZP $X \pm \text{SEM}$
Vesícula Germinal	6.14\pm1.20
Metafase I	7.60\pm1.04
Metafase II	7.64\pm0.63
Ovocito Activado	6.47\pm1.20

IRZP: Índice de retardo del huso meiótico medido en nm.

5. DISCUSIÓN.

El objetivo de este estudio fue evaluar la posibilidad de usar la MLP para obtener parámetros no subjetivos relacionados con la calidad de ovocitos de ovejas prepúberes obtenidos de matadero y madurados *in Vitro*.

Según nuestros resultados, la MLP se muestra como un método eficaz para detectar el huso meiótico en ovocitos ovinos. En el 89% de los ovocitos en MII se detectó una señal positiva de MLP. En otras especies la eficiencia varía dependiendo de la calidad de los ovocitos así como de las características especie específicas, llegando a ser hasta de un 98.2% en porcino (Caamaño et al., 2011).

En nuestro estudio, se observó una correlación positiva entre la señal de MLP y la presencia de proteínas polimerizadas de los microtúbulos. Sin embargo, la correlación entre la señal positiva de MLP y una buena conformación del huso meiótico observada mediante inmunocitoquímica, se reduce en comparación con la anterior y además el hecho de que en 5 de los 33 ovocitos que dan una señal positiva a MLP, el huso presente una conformación anormal, hace que no podamos inferir que la MLP sea una técnica adecuada para determinar la conformación de huso meiótico. Este hecho se corresponde con los resultados obtenidos por Caamaño et al., (2011), en ovocitos porcinos, en los que concluyen que la MLP no es una técnica adecuada para distinguir entre ovocitos con una buena o mala conformación del huso. Coincidiendo también con estudios en ovocitos humanos (Cotichio et al., 2004; Wang et al., 2002; Rienzi et al., 2004) que aseguran que la MLP en solitario, no puede darnos información fiable sobre la conformación del huso en los ovocitos. Sin embargo, en otros estudios realizados en ovocitos humanos, consideran a la MLP como un método apropiado para determinar la configuración del huso meiótico (Bianchi et al., 2005; Wang et al., 2002; Shen et al., 2005-2008). Además, la detección por MLP del huso meiótico en ovocitos, se ha relacionado con el desarrollo potencial de los mismos en cuanto a su capacidad para desarrollar un embrión (Trimarchi et al., 2004) e incluso con el potencial de producir un embarazo (Kilani et al., 2009; Kilani et al., 2006; Madaschi et al., 2009).

El valor de retardo se ha propuesto como un indicador de la conformación del huso meiótico, y por lo tanto de la calidad del ovocito en estudios en humano y ratones (Raju et al., 2007; Kilani et al., 2009). Con los valores de retardo obtenidos en nuestro estudio, no se encontraron diferencias entre los de los ovocitos con un huso normal y los que presentan uno anormal, coincidiendo con los resultados de Caamaño et al., (2011) y Cotichio et al., (2010). Estos resultados sugieren que no se podría utilizar el valor del retardo del huso como un indicador de la conformación del huso meiótico en ovocitos de ovejas prepúberes. Teniendo en cuenta todo lo anteriormente mencionado, podemos concluir que los resultados obtenidos sugieren que la MLP es un método eficaz para detectar la presencia de proteínas polimerizadas de los microtúbulos pero no para diferenciar la buena o mala conformación del huso meiótico en los ovocitos de ovejas prepúberes.

En cuanto al porcentaje de los ovocitos madurados *in Vitro* que llegaron a MII fue del 60%, este resultado está por debajo del porcentaje del 84% observado en estudios de MIV en ovejas adultas (Guler et al., 2000), de alrededor del 65% en cabras

prepúberes y del 72% en cabras adultas (Mogas et., al. 1997). En ovocitos bovinos el porcentaje es todavía mayor estando cerca del 90% (Dieleman et al., 2002). Este menor porcentaje de ovocitos que llegan a MII, podría deberse a deficiencias en el sistema de maduración que se ha utilizado, como también al tipo de animales utilizados (prepúberes). Sin embargo descartamos que el transporte de los ovocitos en criotubos pudiera afectar los resultados ya que se realizaron pruebas previas para descartar este factor. Futuros estudios con mayor tamaño de muestra podrían ayudar a mejorar los índices de maduración.

El valor de retardo de la zona pelúcida se ha propuesto como un indicador de la calidad de los ovocitos en humanos. La ZP tiene una gran importancia durante todo el desarrollo, fertilización y la implantación del embrión (Shen et al., 2005). Durante nuestro estudio hemos encontrado que hay una correlación positiva entre el diámetro total de los ovocitos y el I.R ZP. Para definir más claramente esta relación, dividimos, a los ovocitos que logramos medir el valor de retardo de la ZP, según su diámetro total, en aquellos que tenían uno mayor al valor medio del diámetro total y los que presentaban un diámetro menor que este valor (148,79 μm). Mediante esta clasificación encontramos que los ovocitos con un mayor diámetro total tienen un valor de retardo de la ZP mayor.

Se ha comprobado que el diámetro total de los ovocitos es un factor determinante para el buen funcionamiento de la meiosis y conseguir llegar al desarrollo completo del embrión (Lonergan et al., 1994; Crozet et al., 2000). En estudios desarrollados en ovocitos de cabras prepúberes (Jiménez-Macedo et al., 2006) encontraron una relación entre el diámetro de los ovocitos y la fertilización, teniendo en cuenta que los de mayor diámetro tenían una tasa mayor de fertilización que los de menor tamaño, así mismo en los de mayor tamaño se encontraron una mayor actividad de MPF tras las MIV. Por otra parte, estudios en bovinos (Pujol et al., 2004), cabras (Rodríguez- González et al., 2004-2?) y cerdos (Roca et al., 1998) concluyen en que los ovocitos con mayor diámetro producen blastocistos con mayor número de células. Tomando en consideración todos estos estudios y comparándolos con nuestros resultados, se podría asumir que en nuestro estudio los ovocitos con mayor diámetro serían los que tendrían un potencial mayor de desarrollo. Asimismo, como los de mayor diámetro total son aquellos que tienen un mayor I.R ZP, serían estos los que tendrían una probabilidad más alta de desarrollarse con éxito. En esta misma línea, Mohammadi-Sangcheshmeh et al., (2011), concluye en su estudio que los ovocitos de equino con mayor I.R ZP, tienen una mayor capacidad de

desarrollo embrionario, pudiendo considerar al I.R ZP como un buen indicador del potencial desarrollo de los ovocitos equinos. Del mismo modo, Raju et al., (2007) y Shen et al., (2005) demuestran en ovocitos humanos, que un índice de retardo de la zona pelúcida >3 nm presenta un mayor tasa de desarrollo a blastocisto y tasa de preñez en comparación con valores del I.R ZP <2 nm. Sin embargo, Held et al., (2012), obtienen resultados que indican que los ovocitos bovinos con menor I.R ZP se corresponden con aquellos de mayor calidad y mayor porcentaje de desarrollo hasta blastocistos. También los resultados obtenidos por Koester et al., (2011), indican que los cigotos con un menor I.R ZP tienen mayor capacidad para desarrollarse y concluye que el uso de este parámetro es una técnica efectiva para predecir la capacidad preimplantatoria de los embriones bovinos. La divergencia en los resultados entre los diversos autores podría ser debida a diferencias entre las especies animales y la estructura de su zona pelúcida. Si bien en este trabajo no se ha realizado la fertilización *in Vitro* de los ovocitos, podemos especular que los ovocitos de ovejas prepúberes de mayor diámetro y con un I.R ZP mayor podrían tener una capacidad de desarrollo superior comparado con lo de menor diámetro y menor I.R ZP, si bien esta hipótesis debería ser probada realizando estudios de fertilización *in Vitro*. Hay que tener en cuenta que se ha trabajado con un reducido tamaño de muestra (N=22), ya que el software utilizado está diseñado para ovocitos humanos y no fue capaz de detectar la ZP en todos los ovocitos objeto de nuestro estudio.

Por otra parte, Cheng et al., (2010) en humano demostró que según va avanzando el estadio de desarrollo ovocitario menor es el I.R ZP, en nuestro estudio no encontramos ninguna variación en este valor pudiendo deberse al tamaño de muestra o por el propio desarrollo de los ovocitos de ovejas prepúberes.

Una de las limitaciones de este estudio es que no pudimos realizar el proceso de FIV y CIV, que nos hubiera permitido relacionar los datos obtenidos con parámetros de potencial desarrollo embrionario, pero el escaso tiempo disponible para la realización de este trabajo lo ha hecho imposible y podría ser objeto de futuros estudios.

6. CONCLUSIONES.

1. Se ha logrado detectar el huso meiótico por MLP en ovocitos de ovejas prepúberes.
2. Según nuestros datos, la MLP es un método adecuado para verificar la presencia de proteínas polimerizadas de los microtúbulos pero no sería un método apropiado para determinar la configuración del huso meiótico en ovocitos de oveja prepúberes.
3. El valor del retardo del huso meiótico como indicador de la conformación del huso meiótico de ovocitos en ovejas prepúberes no sería adecuado para distinguir entre aquellos con una conformación normal o anormal.
4. Se tendría que optimizar el software del Oosight para mejorar la detección de la zona pelúcida de los ovocitos de oveja
5. El índice de retardo de la zona pelúcida podría ser utilizado como indicador de los ovocitos de mejor calidad y mayor potencial de desarrollo.
6. Se debería continuar con esta línea de investigación con un mayor tamaño de muestra y combinándolo con FIV, CIV y técnicas que permitan obtener datos de viabilidad embrionaria.

7. REFERENCIAS.

- Alm H, Torner H, Heleil B, Srsen V, Kuzmina T. Apoptosis and pyknosis in cumulus cells from bovine cumulus-oocyte complexes before and after maturation *in Vitro*. *Theriogenology* 2000; 53:447.
- Anguita B, Jimenez-Macedo A.R, Izquierdo D, Mogas T and Paramio M.T. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 2007; 67:526–536.
- Anguita B, Paramio M.T, Jiménez-Macedo A, Morató R, Mogas T, Izquierdo D. Total RNA and protein content, Cyclin B1 expression and developmental competence of prepubertal goat oocytes. *Anim Reprod Sci* 2008; 103: 290 –303.
- Armstrong DT. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology* 2000; 155: 1303–1322.
- Bagg M, Nottle M, Armstrong D, Grupen C. Relationship between follicle size and oocyte developmental competence in prepubertal and adult pigs. *Reprod Fertil Dev* 2007; 19:797– 803.
- Bauskin A.R, Franken D.R, Eberspaecher U, Donner P. Characterization of human zona pellucida glycoproteins. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 534-540.
- Bianchi V, Coticchio G, Fava L et al. Meiotic spindle imaging by Polscope in human oocytes frozen with a slow freezing procedure involving high sucrose concentration. *HumanReproduction* 2005.
- Boone D.L, Tsang B.K. Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biol Reprod* 1998; 58: 1533–9.
- Caamaño J.N, Maside C, Gil M.A, Muñoz M, Cuello C, Díez C, Sánchez-Osorio J.R, D. Martín, Gomis J, Vazquez J.M, Roca, Carrocera J.S, Martinez E.A, Gómez E. Use of polarized light microscopy in porcine reproductive Technologies. *Theriogenology* 2011; 76: 669–677.
- Caamaño J.N, Muñoz M, Diez C and Gómez E. Polarized Light Microscopy in Mammalian Oocytes. *Reprod Dom Anim* 2010; 45; 49–56.
- Cell Coupling and Maturation-Promoting Factor Activity in In vitro-Matured Prepubertal and Adult Sheep Oocytes S. Ledda, L. Bogliolo, G. Leoni, and S. Naitana. *Biology of reproduction* 2001; 65: 247–252.

- Cheng J, Li Huang, Bing He, Fenghua Lu, Xiaoli Wang, Zhengsan Wu, Deshun Shi. Quantitative analysis of the intensity of zona pellucida birefringence of oocytes during IVF cycles. *Reproduction, Fertility and Development* 22(8): 1167–1174.
- Choi T, Fukasawa K, Zhou R et al. The Mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1996; 93: 7032–7035.
- Cognié Y, Poulin N, Locatelli Y, Mermillod P. State-of-the-art production, conservation and transfer of *in-vitro*-produced embryos in small ruminants. *Reproduction Fertility and Development* 2004; 16.
- Coticchio G, Sciajno R, Hutt K, Bromfield J, Borini A, Albertini D.F. Comparative analysis of the metaphase II spindle of human oocytes through polarized light and high-performance confocal microscopy. *Fertil Steril* 2010; 93: 2056–64.
- Coticchio G, Sereni E, Serrao L, Mazzone S, Iadarola I, Borini A. What criteria for the definition of oocyte quality? *Ann NY Acad Sci* 2004; 1034: 132– 44.
- Crozet N, Dahirel M and Gall L. Meiotic competence of in vitro grown goat oocytes. *Reprod Fertil* 2000; 118: 367-373.
- De Wit A.A.C, Cesar M.L.F, Kruip T.A.M. Effect of Urea During In Vitro Maturation on Nuclear Maturation and Embryo Development of Bovine Cumulus-Oocyte-Complexes. *Journal of Dairy Science* 2001; 84 (8): 1800-1804.
- DeSantis L, Cino I, Coticchio G, FM Fusi F.M, Papaleo E, Rabellotti E, Brigante C, Borini A, Ferrari A. Objective evaluation of the viability of cryopreserved oocytes. *Reproductive BioMedicine Online* 2007; 15: 338–345.
- Dieleman S.J, Hendriksen P.J.M., Viuf D, Thomsen P.D, Hyttel P., Knijn H.M, Wrenzyck C, Kruip T.A.M, Niemann H, Gadella B.M, Bevers M.M and Vos P.L.A.M. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology* 2002; 575-20.
- Durkin R.E, Swain J.E, Bormann C.L, Frederick A.M & Krisher R.L. Metabolism of porcine oocytes matured in vivo and in vitro. *Proceedings of the Society for the Study of Reproduction, 34th Annual Meeting, Ottawa, ON, Canada.2001; Abstract* 81.
- Eckert J and Niemann H. *In Vitro* maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. *Theriogenology* 1995; 43: 1211-1225.

- Eppig J, O'Brien M, Wigglesworth K. Mammalian oocyte growth and development in vitro. *Molecular Reproduction and development* 1996; 44: 260-273.
- Farin C.E, Rodriguez K.F, Alexander J.E, Farin P.W. angiogenesis and morphometry of bovine placentas in late gestation from embryos produced in vivo or in vitro. *biol reprod* 2004; 71: 1919-1926.
- Feranil J, Isobe N, Nakao T. Apoptosis in the antral follicles of swamp buffalo and cattle ovary: TUNEL and caspase-3 histochemistry. *Reprod Domest Anim* 2005; 40: 111– 6.
- Fletcher-Holmes D.W, Boutin C, Hoyt C. Assessing Oocyte Quality using Birefringence Imaging.
- Florman H, Storey B. Mouse gamete interactions: The zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization *in vitro*. *Developmental Biology*. 1982; 91: 121-130.
- Fulka J, First N.L and Moor R.M. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol. Hum. Reprod* 1998; 4: 41-49.
- Galli C, Moor R.M. Gonadotrophin requirements for the *in vitro* maturation of sheep oocytes and their subsequent embryonic development. *Theriogenology* 1991; 35: 1083-1093.
- Gandolfi F, Brevini TA, Cillo F, Antonini S. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. *Rev Sci Tech* 2005; 24: 413–23.
- Gerris J, Van Royen E. Avoiding multiple pregnancies in ART: a plea for single embryo transfer. *Human Reproduction* 2000; 15: 1884–1888.
- Guler A, Poulin N, Mermillod P, Terqui M, Cognié Y. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. *Theriogenology* 2000; 54(2): 209-218.
- Harris S.E, Adriaens I, Leese H.J, Gosden R.G & Picton H.M. Carbohydrate metabolism by murine ovarian follicles and oocytes grown in vitro. *Reproduction* 2007; 134: 415–424.
- Harris S.E, Gopichandran N, Picton H.M, Leese H.J & Orsi N.M. Nutrient concentrations in murine follicular fluid and the female reproductive tract. *Theriogenology* 2005; 64: 992–1006.
- Held E, Mertens E.M, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Salilew-Wondim D, Besenfelder U, Havlicek V, Herrler A, Tesfaye D, Schellander K and Holker M. Zona

- pellucida birefringence correlates with developmental capacity of bovine oocytes classified by maturational environment, COC morphology and G6PDH activity. *Reproduction, Fertility and Development* 2012; 24: 568–579.
- Herrick J.R, Brad A.M and Krisher R.L. Chemical manipulation of glucose metabolism in porcine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation in Vitro. *Reproduction* 2006; 131: 289–298.
- Holm P, Callesen H. *In vivo* versus *in vitro* produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod Nutr Dev* 1998; 38: 579-594.
- Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, Shimada A, Kaneko H, Yamashita M, Aoki F, Tojo H, Toyoda Y. Maturation/M-phase promoting factor: a regulator of aging in porcine oocytes. *Biol Reprod* 2000; 63: 715–722.
- Hunter R.H.F. 1991. Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Mol Reprod Dev* 1991; 29: 385–391.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 1997; 47: 23–32.
- Jiménez-Macedo A.R, Anguita B, Izquierdo D, Mogas T, Paramio M.T. Embryo development of prepubertal goat oocytes fertilised by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) according to oocyte diameter. *Theriogenology* 2006; 66: 1065–1072.
- Jimenez-Macedo A.R, Paramio M.T, Anguita B, Morato R, Romaguera R, Mogas T and Izquierdo D. Effect of ICSI and embryo biopsy on embryo development and apoptosis according to oocyte diameter in prepubertal goats. *Theriogenology* 2007; 67: 1399–1408.
- Keefe D, Tran P, Pellegrini C, Oldenbourg R. Polarized light microscopy and digital image processing identify a multilaminar structure of the hamster zona pellucida. *Human Reproduction* 1997; 12: 1250-1252.
- Kilani S, Cooke S, Chapman M. The change of the meiotic spindle over time—a possible marker to optimise ICSI? *The Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2006; 46: A14.
- Kilani S, Cooke S, Kan A, Chapman M. Are there non-invasive markers in human oocytes that can predict pregnancy outcome? *Reprod BioMed Online* 2009; 18: 674–80.
- Koester M, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Montag M, Rings F, Schimming T, Tesfaye D, Schellander K, Hoelker M. Evaluation of bovine zona pellucida characteristics

- in polarized light as a prognostic marker for embryonic developmental potential. *Reproduction Advance Publication* 2011; 10: 471.
- Korhonen K, Kananen K, Ketoja E, Matomäki J, Halmekytö M, Peippo J. Effects of Serum-Free *In Vitro* Maturation of Bovine Oocytes on Subsequent Embryo Development and Cell Allocation in Two Developmental Stages of Day 7 Blastocysts. *Reproduction in Domestic Animals* 2010; 45 (1): 42-49.
- Krisher R.L, Bavister B.D. Enhanced glycolysis after maturation of bovine oocytes in Vitro is associated with increased developmental competence. *Molecular Reproduction and Development* 1999; 53: 19–26.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680–685.
- Ledda S, Bogliolo L, Calvia P, Leoni G, Naitana S. Meiotic progression and developmental competence of oocytes collected from juvenile and adult ewes. *J Reprod Fertil* 1997; 109: 73–8.
- Leoni G, Bebbere D, Succu S, Berlinguer F, Mossa F, Galioto M, Bogliolo L, Ledda S, Naitana S. Relations between relative mRNA abundance and developmental competence of ovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 2007; 74: 249-257.
- Leoni G, Succu S, Satta V, Paolo M, Bogliolo L, Bebbere D, Spezzigu A, Madeddu M, Berlinguer F, Ledda S, Naitana S. In Vitro production and cryotolerance of prepubertal and adult goat blastocysts obtained from oocytes collected by laparoscopic oocyte-pick-up (LOPU) after FSH treatment. *Reprod Fertil Dev* 2009; 21: 901– 8.
- Lequarre A, Vigneron C, Ribaucour F, Holm P, Donnay I, Dalbiès-Tran R, Callesen H, Mermillod P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology* 2005; 63(3): 841-859.
- Li J, Liu DJ, Cang M, Wang LM, Jin MZ, Ma YZ and Shorgan B. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. *Animal Reproduction Science* 2009; 114: 89–98.
- Liu L and Keefe D.L. Ageing-associated aberration in meiosis of oocytes from senescence-accelerated mice. *Hum. Reprod* 2002; 17: 2678-2685.
- Madaschi C, Aoki T, Paes de Almeida Ferreira Braga D, de Cássia Sávio Figueira R, Semião Francisco L, Iaconelli Jr A, Borges Jr. E. Zona pellucida birefringence

- score and meiotic spindle visualization in relation to embryo development and ICSI outcomes. *Reproductive BioMedicine Online* 2009; 18 (5): 681-686.
- Majerus V, Lequarré A, Ferguson E, Kaidi S, Massip A, Dessy F, Donnay I. Characterization of embryos derived from calf oocytes: kinetics of cleavage, cell allocation to inner cell mass, and trophectoderm and lipid metabolism. *Mol Reprod Dev* 2000; 57: 346–52.
- Mandelbaum J, Anastasiou O, Levy R, Guerin J.F, de Larouziere V, Antoine J.M. Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2004; 113: 17–23.
- Marc Pujol , Manel López-Béjar , Maria-Teresa Paramio. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology* 2004; 61(4):735-744.
- Marchal R, Feugang J, Perreau C, Venturi E, Terqui M, Mermillod P. Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology* 2001; 56:17–29.
- Martino A, Mogas T, Palomo M, Paramio M. Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 1994; 41: 969–80.
- Martino A, Palomo M.J, Mogas T and Paramio M.T. Influence of the collection technique of prepubertal goat oocytes on *in Vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology* 1994; 42: 859–873.
- Masui, Y., and C.L. Market. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool* 1971; 177: 129–145.
- Mattioli M, Galeati G, Bacci ML, Seren E. Follicular factors influence oocyte fertilizability by modulating the intercellular cooperation between cumulus cells and oocyte. *Gamete Res* 1988; 21: 223–232.
- Sutton-McDowall, M.L Gilchrist R.B and Thompson J.G. Cumulus expansion and glucose utilisation by bovine cumulus–oocyte complexes during *in vitro* maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. *Reproduction* 2004; 128: 313-319.
- Mermillod P, Oussaid B, Cognié Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil Suppl.* 1999; 54: 449-60.

- Mogas T, M.J. Palomo M.J, Izquierdo M.D and Paramio M.T. Developmental capacity of in Vitro matured and fertilized oocytes from prepubertal and adult goats. *Theriogenology* 1997; 47:1169-1203.
- Mohammadi-Sangcheshmeh A, Held E, Tesfaye D, Schellander K and Hoelker M.160 zona pellucida birefringence correlates with cumulus morphology and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of equine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development* 2011; 24 (1):192-192.
- Moor R.M and Trounson A.O. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in Vitro and their subsequent developmental capacity. *J. Reprod. Fert* 1977; 49: 101-109.
- Moor R.M, Dai Y, Lee C and Fulka Jr J. Oocyte maturation and embryonic failure. *Human Reproduction* 1998; 4: 222-226.
- Moor R.M. Oocyte maturation. In: *Fertilization in mammals. Serono Symposia, U.S.A.* Bavister, B.J. Cummins, J. & Roldan, E.R. (eds.). 1990; 1-4.
- Morató R, Izquierdo D, Albarracín J.L, Anguita B, Palomo M.J, Jiménez-Macedo A.R, Paramio M.T, Mogas T. Effects of pretreating in Vitro-matured bovine oocytes with the cytoskeletonstabilizing agent taxol prior to vitrification. *Mol Reprod Dev* 2008; 75:191–201.
- Nicholas B, Alberio R, Fouladi-Nashta A, Webb R. Relationship between low-molecular-weight insulin-like growth factor-binding proteins, caspase-3 activity, and oocyte quality. *Biol Reprod* 2005; 72: 796–804.
- Noguchi S, Nakano M. Structural characterization of the N-linked carbohydrate chains from mouse zona pellucida glycoproteins Z2P and ZP3. *Biochem Biophys Acta* 1993; 1158: 217-226.
- O'Brien J.K, Dwarte D, Ryan J.P, Maxwell W.M and Evans G. Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. *Reproduction, Fertility, and Development* 1996; 7: 1029–1037.
- Oldenbourg R, Mei G. New polarized light microscope with precision universal compensator. *J Microsc* 1995; 180: 140–7.
- Pelletier C, Keefe D, Trimarchi J. Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. *Fertility and Sterility* 2004; 81: 850-856.

- Pelletier C, Keefe D.L, and Trimarchi J.R. Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. *Fertility and sterility* 2004; 84.
- Peters JK, Milliken G & Davis DL. Development of porcine embryos in Vitro: effects of culture medium and donor age. *Journal of Animal Science* 2001; 79: 1578–1583.
- Phillips D.M, Shalgi R. Surface architecture of the mouse and hamster zona pellucida and oocyte. *Journal of Ultrastructure* 1980; 72: 1-12.
- Picton H, Briggs D, Gosden R. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1998; 145: 27-37.
- Raju R.G, Prakash G.J, Krishna K.M, Madan K. Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging. *Reprod BioMed Online* 2007; 14: 166 –74.
- Revel F, Mermillod P, Peynot N, Renard J.P & Heyman Y. Low developmental capacity of in Vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 1995; 103: 115–120.
- Rienzi L, Martinez F, Ubaldi F, Minasi MG, Iacobelli M, Tesarik J, Greco E. Polscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures. *Human Reprod* 2004; 19: 655–9.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP and Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in Vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development* 2002; 61: 234–248.
- Roca J, Martinez E, Vazquez J.M and Lucas X. Selection of immature pig oocytes for homologous *in vitro* penetration assays with the brilliant cresyl blue test. *Reproduction, Fertility and Development* 1998; 10(6): 479-486.
- Shen Y, Betzendahl I, Tinneberg H, Eichenlaub-Ritter U. Enhanced polarizing microscopy as a new tool in aneuploidy research in oocytes. *Mutation Research* 2008; 651: 131-140.
- Shen Y, Betzendahl I, Suna F, Tinneberg H-R , Eichenlaub-Ritter U. Non-invasive method to assess genotoxicity of nocodazole interfering with spindle formation in mammalian oocytes. *Reprod Toxicol* 2005; 19: 459 –71.

- Shen Y, Stalf T, Mehnert C, Eichenlaub-Riter U, Tinneberg H.R. High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles Hum Reprod 2005; 20: 1596-606.
- Spindler R.E, Pukazhenti B.S and Wildt D.E. Oocyte metabolism predicts the development of cat embryos to blastocyst in Vitro. Molecular Reproduction and Development 2000; 56: 163–171.
- Kilani S, Cooke S, Kan A, Chapman M. Are there non-invasive markers in human oocytes that can predict pregnancy outcome?. Reproductive BioMedicine Online 2009; 18: 678-680.
- Thompson J.G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos. A decade of achievement. Animal Reproduction Science 2000; 60: 263-275.
- Thompson, J.G., Mitchell, M., Kind, K.L. Embryo culture and long-term consequences. Reprod. Fertil Develop. 2007; 19: 43–52.
- Trimarchi JR, Karin RA, Keefe DL 2004 Average spindle retardance observed using the PolScope predicts cell number in day 3 embryos. Fertility and Sterility 2004; 82: 268.
- Velilla E, Izquierdo D, Rodríguez-González E, López-Béjar M, Vidal F, Paramio M.T. Distribution of prepubertal and adult goat oocyte cortical granules during meiotic maturation and fertilisation: ultrastructural and cytochemical study. Mol Reprod Dev 2004; 68:507–14.
- Velilla E, Rodriguez-Gonzalez E, Vidal F, Izquierdo D & Paramio M.T. Mitochondrial organization in prepubertal goat oocytes during in Vitro maturation and fertilization. Molecular Reproduction and Development 2006; 73: 617–626.
- Velilla E, Rodríguez-González E, Vidal F, Paramio MT. Microtubule and microfilament organization in immature, in Vitro matured and in Vitro fertilized prepubertal goat oocytes. Zygote 2005; 13:155– 65.
- Wang W.H, Keefe D.L. Prediction of chromosome misalignment among in Vitro matured human oocytes by spindle imaging with the Polscope. Fertil Steril 2002; 78: 1077–81.
- Wang WH, Keefe DL. Spindle observation in living mammalian oocytes with the polarization microscope and its practical use. Clon Stem Cells 2002; 4: 269 –76.

ANEXO FOTOGRAFICO

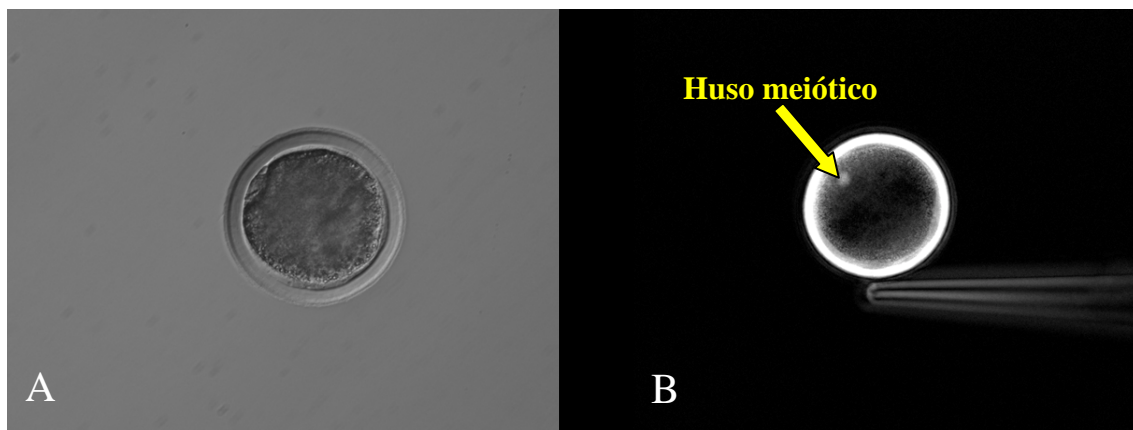


Fig. 3. Ovocito de oveja prepúber en metafase II observado con (A) microscopía convencional y (B) microscopía de luz polarizada. (A-B) Magnificación original X 200.

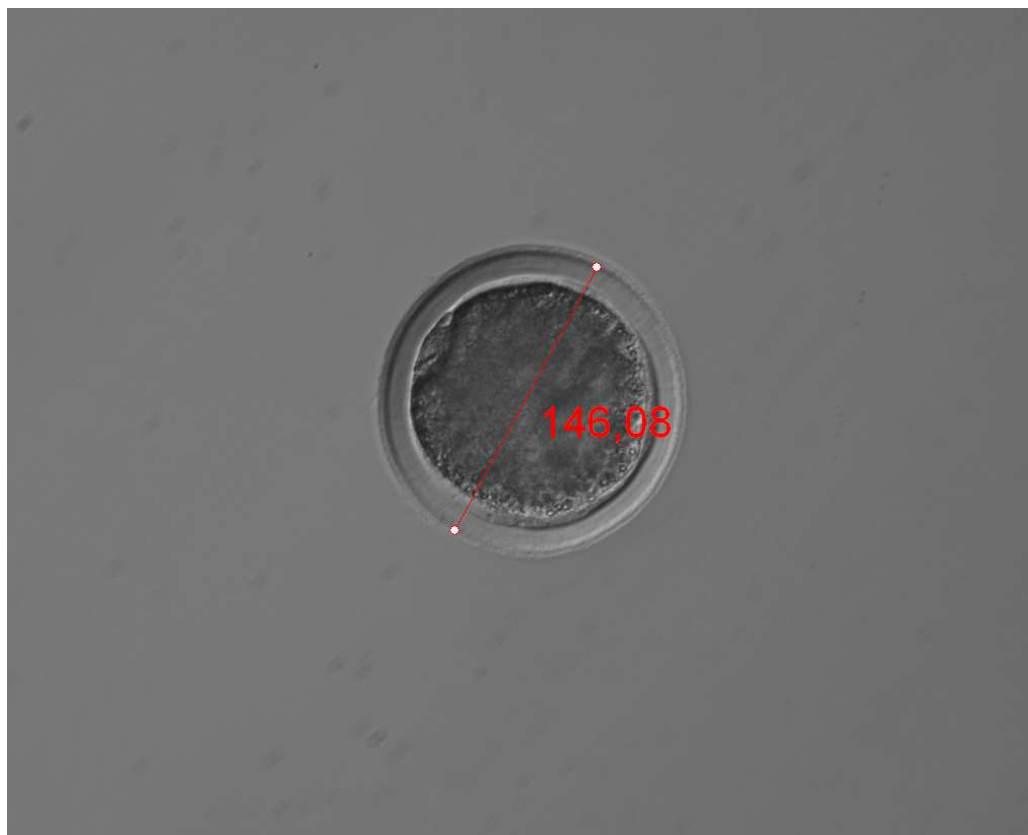


Fig. 4. Ovocito de oveja prepúber en MII mediante microscopía convencional, con medida de diámetro total, mediante el software Oosight. Magnificación original X 200.

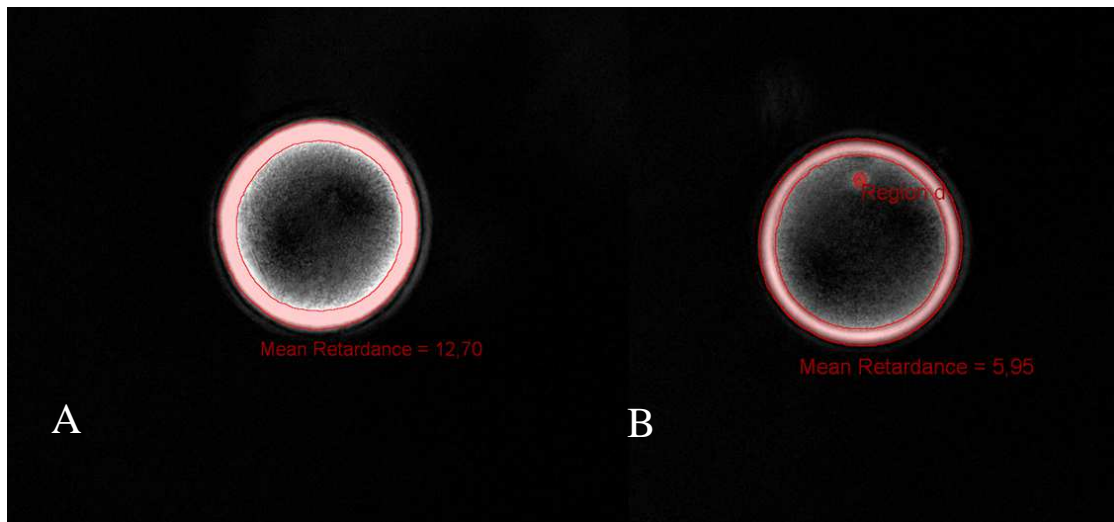


Fig. 5. Ovocitos de ovejas prepúberes en metafase II tomada con microscopía de luz polarizada donde se observa (A y B) la birrefringencia de la zona pelúcida y medición de su valor de retardo medio (Mean Retardance) y (B) la determinación del valor de retardo medio del huso meiótico (Region d). (A-B) Magnificación original X 200.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor del trabajo fin de Master, Dr. D. José Néstor Caamaño Gualdoni por ayudarme y no perder la paciencia conmigo durante la realización del mismo.

A toda la gente del Serida de Deva, que me han tratado como a uno más y me han ofrecido su apoyo durante el tiempo que he estado allí.

A todos mis compañer@s, por hacer que este intenso curso fuera mucho más llevadero.

Al fondo Norte, por todo lo que hemos compartido tanto dentro como fuera del aula. Espero repetir muchas veces la “Noche de Fer”.

En último lugar, pero no por ello menos importante, a mis padres que siempre están ahí para apoyarme, darme cariño y aguantarme.

Muchísimas Gracias.