

## Competencia del ovocito bovino obtenido por *ovum pick-up* valorado mediante el azul brillante de cresilo

COMPETENCE OF THE BOVINE OOCYTE OBTAINED BY OVUM PICK-UP AS EVALUATED BY THE BRIGHT CRESYL BLUE TEST

Luis Ayala G.<sup>1</sup>, Jorge Samaniego C.<sup>1,3</sup>, Pedro Nieto E.<sup>1</sup>, Ramiro Rodas C.<sup>1</sup>,  
Jorge Dután S.<sup>1</sup>, Guido Calle O.<sup>1</sup>, Yury Murillo A.<sup>1</sup>, Juan Vázquez M.<sup>1</sup>,  
Daniel Argudo G.<sup>2</sup>, Fernando Perea G.<sup>1</sup>

### RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue valorar la prueba del azul brillante de cresilo (BCB) como método indirecto para seleccionar ovocitos competentes para la producción *in vitro* de embriones (PIV). Los complejos cúmulos-ovocitos (COC) fueron obtenidos de dos vaquillas criollas sometidas a dos tratamientos: T1 = COC recuperados por OPU (*ovum pick-up*) previa estimulación con FSH-LH; T2 = COC recuperados sin previa estimulación de la donante (testigo). Las dos vaquillas fueron alternadas en los dos tratamientos y se hicieron cinco repeticiones. Los COC recuperados fueron clasificados en tipos A, B, C y D. Luego se aplicó la prueba del BCB a cada uno de los tipos de COC para determinar si son BCB+ o BCB-. T1 permitió recuperar 5.2 más COC que T2 ( $p < 0.05$ ). Al aplicar la prueba del BCB se determinó que todos los ovocitos tipo A de T1 y T2 fueron BCB+; es decir, terminaron su crecimiento y se encontraban listos para iniciar el proceso de maduración *in vitro*; sin embargo, alrededor del 50% de los COC tipo B, C y D de T1 y T2 fueron BCB+. Se concluye que la selección de COC basado en las características morfológica es un método confiable únicamente para los de tipo A, y tiene un 50% de error para los COC de tipo B, C y D y, por lo tanto, la aplicación de la prueba del BCB permite mejorar esta selección de forma no invasiva.

**Palabras clave:** COC bovinos; morfología ovocitaria; BCB; G6PDH

<sup>1</sup> Carrera de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Ecuador

<sup>2</sup> Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Ecuador

<sup>3</sup> E-mail: jorgereivax@hotmail.com

Recibido: 17 de octubre de 2017

Aceptado para publicación: 16 de febrero de 2018

## ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the bright blue cresyl (BCB) test as an indirect method to select competent oocytes for the *in vitro* production of embryos (IVP). The cumulus-oocyte complexes (COC) were obtained from two Creole heifers subjected to two treatments: T1 = COC recovered by OPU (ovum pick-up) previous stimulation with FSH-LH; T2 = COC recovered from non-stimulated animals (control). The two heifers were alternated in the two treatments and five repetitions were done. Recovered COCs were classified into types A, B, C and D. Then the BCB test was applied to each of the COC types to determine if they were BCB+ or BCB-. T1 allowed to recover 5.2 more COC than T2 ( $p < 0.05$ ). When applying the BCB test, it was determined that all type A oocytes of T1 and T2 were BCB+; that is, they finished their growth and were ready to start the process of *in vitro* maturation; however, about 50% of the type B, C and D COCs of T1 and T2 were BCB+. It is concluded that the selection of COC based on morphological characteristics is a reliable method only for type A and has a 50% error for COC type B, C and D and, therefore, the application of the BCB test allows to improve this selection non-invasively.

**Key words:** bovine COC; oocyte morphology; BCB; G6PDH

## INTRODUCCIÓN

La clasificación morfológica de los COC (complejos cumulus ovocitos), junto a la determinación del diámetro folicular y ovocitario, han sido los métodos más utilizados para la selección de gametas de óptima calidad previo a la producción *in vitro* de embriones (PIV) (Marchal *et al.*, 2002; Anguita *et al.*, 2007; Carrasco, 2012). En un principio, los COC aptos para PIV fueron seleccionados mediante criterios morfológicos que proporcionaban pautas razonables para identificar el potencial de fertilización, tomando en cuenta el espesor (número de capas), la compactación del cumulus, la homogeneidad y la tonalidad del ooplasma (Gordon, 2003); lo cual en el bovino ha demostrado una alta variabilidad al momento de evaluar el citoplasma debido a su poca o nula traslucidez, situación que no sucede en otras especies en las cuales la clasificación morfológica se correlaciona directamente con una buena capacidad de desarrollo (Goovaerts *et al.*, 2010). Sin embargo, en los últimos años se ha comprobado que

estos métodos son ineficientes, ya que apenas el 60% de los COC seleccionados alcanzan la fase de blastocisto posterior a la fecundación (Alm *et al.*, 2005).

Ensayos realizados han demostrado que COC inmaduros sintetizan una variedad de proteínas durante su crecimiento, entre ellas la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH), la cual es sintetizada en la mitad de la primera fase (S) de crecimiento ovocitario y que disminuye conforme el ovocito termina su fase de crecimiento (Wassarman, 1988). Autores como Ericsson *et al.* (1993) y Roca *et al.* (1998) describieron que la tinción con azul brillante de cresilo (BCB) permite seleccionar de una manera no invasiva y perturbadora a los COC más homogéneos y competentes para la PIV; esto debido a que permite cuantificar la actividad de la enzima G6PDH, considerando a ovocitos que retienen la tinción como aquellos que terminaron su crecimiento (BCB+; G6PDH inactiva) y ovocitos incoloros a aquellos que se encuentran en crecimiento (BCB-; G6PDH activa) (Pujol *et al.*, 2004).

Al ser considerada como una técnica relativamente nueva, existe poca documentación y mucha controversia en las diferentes especies de interés zootécnico; así, Mirshamsi *et al.* (2013) establecieron que un 54.3% de COC bovinos morfológicamente compactos eran BCB+ y podría ser utilizado para PIV; esto es corroborado por Pujol *et al.* (2004) quienes encontraron un porcentaje mayor de COC BCB+ en ovocitos de grado 1 (78.6%) a comparación de COC grado 2 (66.2%) y grado 3 (51.1%). Sin embargo, en otras especies, Katska-Ksiazkiewicz *et al.* (2007) señalaron que no existe diferencia en la competencia de desarrollo entre ovocitos BCB+ y ovocitos clasificados como grado 1 (control) obtenidos de cabras. El presente estudio tuvo como objetivo utilizar la prueba del azul brillante de cresilo como método indirecto para seleccionar ovocitos de mayor competencia para la PIV.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colección de los COC

Se utilizaron dos vaquillas criollas como donadoras de ovocitos, que fueron alternadas en dos tratamientos (T1: COC recuperados de vaquillas estimuladas; T2: COC recuperados de vaquillas no estimuladas [testigo]), cada uno con cinco repeticiones. Las hembras fueron sometidas al proceso de estimulación hormonal propuesto por Ruiz *et al.* (2013): Día 0: GnRH (Conceptal<sup>®</sup>, Intervet), 0.2 mg i.m.; Día 2: 500 UI FSH-LH (Pluset<sup>®</sup>, Laboratorios Calier, Barcelona); y 48 h después Ovum Pick-up (OPU).

Todos los folículos  $\geq 4$  mm y  $\geq 8$  mm fueron aspirados con el apoyo de un ecógrafo portátil (Prosound 2, Aloka, Japón) con un transductor sectorial de 5 MHz. Este último fue ensamblado en un soporte para sonda, que contenía la guía de punción conformada por una aguja (1.2x75 mm) conectada a una bomba de vacío (BV-003D, WTA, Brasil) con una presión de aspiración de 70 mmHg. Los

COC recuperados fueron transportados en solución tampón fosfato salino (PBS) a 37 °C al laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, Ecuador,

### Clasificación

Los COC fueron clasificados morfológicamente según los criterios descritos por Le Guenne (1999) en: A = ovocito de apariencia compacta con más de cuatro capas de células del cumulus, citoplasma granular uniforme y transparente; B = ovocito con 1 a 3 capas de células del cumulus que cubren la zona pelúcida, con citoplasma opaco, total o parcialmente homogéneo y finamente granulado; C = ovocitos totalmente desnudos, y/o citoplasma con zonas oscuras irregulares y D = ovocitos deformados con células de la granulosa que cubren parcial o totalmente la zona pelúcida o completamente expandidos con cumulus disperso y descolorido.

### Prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB)

Todos los ovocitos seleccionados como A, B, C y D fueron colocados en 26  $\mu$ M de BCB (B-5388, Sigma-Aldrich) diluido en PBS de Dulbecco durante 90 minutos a 38 °C y CO<sub>2</sub> al 5%. Luego, cada grupo de ovocitos fue lavado tres veces en una solución atemperada de PBS y examinado bajo estereoscopia para determinar si habían terminado su crecimiento (BCB+) o no (BCB-) (Pujol *et al.*, 2004).

### Diseño Experimental

Como criterio de inclusión se consideraron ovocitos provenientes de folículos con diámetro entre 4 y 8 mm y como criterio de exclusión a ovocitos contaminados con bacterias durante el cultivo. La punción folicular se realizó una vez por semana entre diciembre de 2016 y marzo de 2017. Todas las punciones fueron realizadas por el mismo Médico Veterinario.

Se utilizó un modelo lineal general a través del PROC GLM en el SAS v. 9.3 (SAS, 2013). Las diferencias entre medias se compararon mediante la prueba de Tukey-Kramer.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Cuadro 1 muestra la relación entre el número de folículos visualizados por ecografía y el número de COC recuperados por OPU. Como era de esperarse, el tratamiento 1 (con estimulación) permitió recuperar 5.2 más COC que el grupo testigo (sin estimulación) ( $p < 0.05$ ). La tasa de recuperación en T1 fue 17.1% superior a T2 ( $p < 0.05$ ). El porcentaje de recuperación denota la eficiencia alcanzada en la técnica del OPU, en tanto que la diferencia entre tratamientos podría ser explicada por el protocolo de estimulación utilizado, que permite obtener folículos más homogéneos que facilitan la punción ecoguiada (Pieterse *et al.*, 1988; De Roover *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2008). Asimismo, los resultados obtenidos concuerdan con De Roover *et al.* (2005), quienes señalan que un animal estimulado hormonalmente antes del OPU aumenta significativamente el número de folículos visualizados y COC recuperados con respecto a aquellos que no recibieron estimulación.

En el Cuadro 2 se puede observar que del total de COC recuperados ( $9.0 \pm 0.63$ ) de animales estimulados hormonalmente, el 26.7% corresponden al tipo A, 34.4% al B, 21.1% al C y 17.8% al D, mientras que para T2, el 13.8% fueron clasificados como A, 25.0% como B, 47.4% como C y 13.8% como D, siendo las frecuencias en los tipos A, B y D significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Diversos autores consideran a ovocitos de las categorías A y B como aptos para PIV y a C y D como no aptos para esta biotecnología (Humblot *et al.*, 2005; Ireland *et al.*, 2007; Katska-Ksiazkiewicz *et al.*,

2007). Es así, que se puede decir que en el 61.1% de los ovocitos en T1 serían considerados como aptos y en solo el 38.8% en T2 serían aptos. Esto es corroborado por Restrepo *et al.* (2011) quienes describen que este comportamiento se debe al efecto de la FSH y LH, que no solo permite el reclutamiento y crecimiento de un mayor número de folículos (efecto FSH) sino que, además, ejerce un efecto favorable sobre la calidad de los COC recuperados (efecto LH). Blondin *et al.* (2012) señalaron que ovocitos provenientes de hembras no estimuladas hormonalmente tuvieron menor competencia que ovocitos de hembras estimuladas, lo cual concuerda con los resultados de esta investigación.

Al realizar la prueba del BCB, se determinó que el 100% de los ovocitos de tipo A, tanto de T1 como de T2, son BCB+; es decir, terminaron su crecimiento y pueden continuar con su proceso de maduración. Este resultado es mayor al obtenido por Pujol *et al.* (2004) quienes determinaron un 78.6% de BCB+ en ovocitos de tipo 1. Esta diferencia puede ser explicada por la procedencia de los ovocitos que en su investigación fueron de ovarios de matadero. Rodríguez *et al.* (2002) y Alm *et al.* (2005) ratifican que la prueba de BCB se ve influenciada directamente por el grado morfológico de los ovocitos.

Alrededor del 55% de los ovocitos de tipo B son BCB+, lo que permite argumentar de que no todos los ovocitos de tipo B están listos para continuar con el proceso de maduración. Este comportamiento fue observado por Pujol *et al.* (2004), quienes demostraron que un 34% de los ovocitos seleccionados para PIV, según criterios morfológicos (grados 1 al 3), no han terminado su crecimiento; es decir, eran BCB-. Así mismo, se encontró un porcentaje mayor de BCB+ en COC de grado 1 en comparación con COC grado 2, e igual comportamiento fue observado entre COC de grado 2 y 3.

Cuadro 1. Número de folículos visualizados (n [promedio  $\pm$  error estándar]) mediante ultrasonido y COC recuperados (%) por ovum pick-up<sup>1</sup>

	Folículos visualizados	COC recuperados	Recuperación
T1, COC recuperados de vaquillas estimuladas	112 (11.2 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup> )	90 (9.0 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup> )	80.4 <sup>a</sup>
T2, COC recuperados de vaquillas no estimuladas	60 (6.0 $\pm$ 0.89 <sup>b</sup> )	23 (3.8 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup> )	63.3 <sup>b</sup>
Total	172 (17.2)	113 (12.8)	65.7

<sup>1</sup> Cinco colecciones por vaquilla por tratamiento<sup>a,b</sup> Valores con letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística (p<0.05)Cuadro 2. COC (promedio  $\pm$  error estándar, [porcentaje]) clasificados en base a su morfología (A, B, C, D)<sup>1</sup> por tratamiento y su actividad al azul brillante de cresilo (BCB)

	A	B	C	D
COC				
T1	2.4 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup> (26.7)	3.1 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup> (34.4)	1.9 $\pm$ 0.44 (21.1)	1.6 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup> (17.8)
T2	0.5 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup> (13.8)	0.9 $\pm$ 0.50 <sup>b</sup> (25.0)	1.8 $\pm$ 0.40 (47.4)	0.5 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup> (13.8)
BCB+				
T1	2.4 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup> (100)	1.7 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup> (54.8)	1.3 $\pm$ 0.36 (68.4)	0.9 $\pm$ 0.26 (56.3)
T2	0.5 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup> (100)	0.5 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup> (55.5)	1.0 $\pm$ 0.33 (55.5)	0.3 $\pm$ 0.24 (60.0)
BCB-				
T1	0.0 $\pm$ 0.00 (0)	1.4 $\pm$ 0.54 (45.2)	0.6 $\pm$ 0.34 (31.6)	0.7 $\pm$ 0.23 (43.7)
T2	0.0 $\pm$ 0.00 (0)	0.3 $\pm$ 0.49 (44.5)	0.9 $\pm$ 0.31 (44.5)	0.1 $\pm$ 0.21 (40.0)

T1: COC recuperados de vaquillas estimuladas; T2, COC recuperados de vaquillas no estimuladas

<sup>1</sup> Le Guienne (1999)<sup>a,b</sup> Letras diferentes dentro de columnas indican grupos diferentes (p<0.05)

Por otra parte, al analizar los ovocitos de tipo C y D en conjunto no se observan diferencias entre tratamientos, pero se determinó que alrededor del 60% habían culminado su crecimiento (BCB+). En cuanto a los COC de tipo C (COC denudados), un alto porcentaje (aprox. 61%) fue BCB+. Este comportamiento pudo ser efecto indirecto de factores técnicos relacionados con la geome-

tría de la aguja (diámetro, longitud, afilado, ángulo, etc.) o la presión de aspiración que produjo pérdida de las células del cúmulo (Ruiz, 2010; Boni, 2012). En cuanto a los ovocitos de tipo D, su comportamiento BCB+ se debe a que morfológicamente son maduros; es decir, terminaron su crecimiento y, es por eso que, diversos investigadores excluyen a estos ovocitos de la PIV, al ser consi-

derados como no aptos para esta biotecnología (Pujol *et al.*, 2004; Alm *et al.*, 2005; Chaubal *et al.*, 2006; Ireland *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2008). Por otra parte, se observa que alrededor del 50% de los ovocitos tipo D son BCB-, y se considera que estos son ovocitos producto de folículos en fase de atresia.

## CONCLUSIONES

La selección de COC apoyada en la prueba no invasiva del azul brillante de cresilo (BCB) permite mejorar la selección de gametos que tradicionalmente se fundamenta en la morfología y características del citoplasma del ovocito.

## LITERATURA CITADA

1. **Alm H, Torner H, Löhrke B, Viergutz T, Ghoneim IM, Kanitz W. 2005.** Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology* 63: 2194-2205. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.050
2. **Anguita B, Jimenez-Marcedo A, Izquierdo D, Mogas T, Paramio M. 2007.** Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 67: 526-536. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.09.003
3. **Blondin P, Vigneault C, Nivet AL, Sirard MA. 2012.** Improving oocyte quality in cows and heifers - What have we learned so far? *Anim Reprod* 9: 281-289.
4. **Boni R. 2012.** Ovum pick-up in cattle: a 25 yr retrospective analysis. *Anim Reprod* 9: 362-369.
5. **Carrasco R. 2012.** Uso de azul brillante de cresilo en la selección de ovocitos bovinos: Implicancias en la maduración nuclear y citoplasmática *in vitro*. Tesis de Médico Veterinario: Vadiivia, Chile: Univ. Austral de Chile. 22 p.
6. **Chaubal SA, Molina JA, Ohlrichs CL, Ferre LB, Faber DC, Bols PE., Riesen JW, Yang, X. 2006.** Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology* 65: 1631-1648. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.07.020
7. **Ding L, Tian H, Wang J, Chen J, Sha H, Chen J, Cheng G. 2008.** Different intervals of ovum pick-up affect the competence of oocytes to support the preimplantation development of cloned bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 75: 1710-1715. doi: 10.1002/mrd.20922
8. **Ericsson SA, Boice ML, Funahashi H, Day BN. 1993.** Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue. *Theriogenology* 39: 214. doi: 10.1016/0093-691X(93)90069-H
9. **Goovaerts I, Leroy J, Jorssen E, Bols P. 2010.** Non invasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture. *Theriogenology* 74: 1509-1520. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.06.022
10. **Gordon I. 2003.** Laboratory production of cattle embryos. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge: CAB International. 592 p.
11. **Humblot P, Holm P, Lonergan P, Wrenzycki C, Leguarré AS, Joly CG, Fermann D, et al. 2005.** Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 63: 1149-1166. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.06.002
12. **Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland J, Smith GW, Lonergan P, Evans AC. 2007.** Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with

- FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod* 22: 1687-1695. doi: 10.1093/humrep/dem071
13. **Katska-Ksiazkiewicz L, Opiela J, Rynska B. 2007.** Effects of oocyte quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastocyst production in goats. *Theriogenology* 68: 736-744. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.06.016
  14. **Le Guienne M. 1999.** Atlas of the bovine oocyte. *AETE Newsletter* 10 : 6-8.
  15. **Marchal R, Vignerot C, Perreau C, Bali-Papp A, Mermillod P. 2002.** Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology* 57: 1523-1532. doi: 10.1016/S0093-691X(02)00655-6
  16. **Mirshamsi SM, Karamishabankareh H, Ahmadi-Hamedani M, Soltani L, Hajarian H, Abdolmohammadi AR. 2013.** Combination of oocyte and zygote selection by brilliant cresyl blue (BCB) test enhanced prediction of developmental potential to the blastocyst in cattle. *Anim Reprod Sci* 136: 246-251. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.11.002
  17. **Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TA, Taverne MA. 1988.** Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30: 751-762. doi: 10.1016/0093-691X(88)90310-X
  18. **Pujol M, López-Bejar M, Paramio MT. 2004.** Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology* 61: 735-744. doi:10.1016/S0093-691X(03)00250-4
  19. **Restrepo G, Gómez J, Vásquez N. 2011.** Evaluación de la superestimulación ovárica y la calidad morfológica de oocitos bovinos obtenidos por aspiración folicular. *Rev Politécnica* 7(13): 16-21.
  20. **Roca J, Martínez E, Vázquez JM, Lucas X. 1998.** Selection of immature pig oocytes for homologous *in vitro* penetration assays with the brilliant cresyl blue test. *Reprod Fert Dev* 10: 479-485. doi: 10.1071 /RD98060
  21. **Rodríguez-González E, López-Béjar M, Velilla E, Paramio MT. 2002.** Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology* 57: 1397-1409. doi: 10.1016/S0093-691X(02)00645-3
  22. **De Roover R, Bols P, Genicot G, Hanzen C. 2005.** Characterisation of low, medium and high responders following FSH stimulation prior to ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval in cows. *Theriogenology* 63: 1902-1913. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.08.011
  23. **Ruiz S. 2010.** Ovum pick up (OPU) en bovinos: aplicaciones en biotecnología de la reproducción. *Cría y Salud* 31: 58-64.
  24. **Ruiz S, Romero J, Astiz S, Peinado B, Almela L, Poto A. 2013.** Application of reproductive biotechnology for the recovery of endangered breeds: birth of the first calf of Murciana-Levantina bovine breed derived by OPU, *in vitro* production and embryo vitrification. *Reprod Domest Anim* 48: e81-e84. doi: 10.1111/rda.12179
  25. **SAS. 2013.** SAS Users guide. Cary , N.C, USA.
  26. **Torres J, de FA Pires M, de Sá, WF, de M Ferreira, A, Viana JH, Camargo LS., Ramos AA, et al. 2008.** Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 69: 155-166. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.06.023
  27. **Wassarman M. 1988.** The mammalian ovum. En: Knobil E, Neil D (eds). *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press. p. 69-102.