

Comparación de dos técnicas para la obtención de complejos *cumulus* ovocito porcinos*

Comparison of two collection techniques for the obtaining of porcine cumulus oocyte complexes

LORENZO, MS¹., TELLO, MF¹., FISCHMAN, ML²., CLAVER, J¹., LOMBARDO, DM¹.

¹Cátedra de Histología y Embriología. ²Cátedra de Física Biológica. Instituto de Investigación y Tecnología Reproducción Animal Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Chorroarín 280 (C1427CWO) Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

La selección de ovocitos de calidad es clave para el éxito de la producción *in vitro* de embriones. La técnica de obtención de complejos *cumulus* ovocito (COC) parecería influir en la calidad de los ovocitos. En objetivo del presente trabajo fue comparar dos métodos de obtención de COC porcinos: *slicing* y aspiración folicular, determinando en cada caso, el porcentaje de maduración meiótica ovocitaria y la apoptosis temprana y tardía en el COC. Al utilizar aspiración folicular se obtuvieron porcentajes significativamente mayores en la maduración nuclear ovocitaria, sin embargo, esta técnica quedó restringida para folículos antrales grandes. Asimismo, se recuperó menor cantidad de ovocitos por ovario que por el método de *slicing*. Por otra parte, el desarrollo del proceso apoptótico en los COC porcinos no estaría relacionado con el método de recuperación utilizado.

Palabras clave: (COC porcinos), (apoptosis), (aspiración folicular), (*slicing*)

Correspondencia *e-mail*: dlombard@fvvet.uba.ar

Recibido: 24/09/2014

Aceptado: 01/08/2015

* Premio Estímulo a la Investigación Científica (categoría graduados), otorgado por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires y el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. Resolución (CD) N° 406/14. Este trabajo se financió con el UBACYT 2014-2017, código: 20020130100737BA.

ABSTRACT

The selection of high quality oocytes is a key for the succeeding of *in vitro* embryo production. The oocyte collection techniques would be related to its quality. The aim of this study was to compare two different porcine *cumulus* oocyte complexes (COCs) collection methods: slicing and follicular aspiration. The rate of nuclear maturation and early and late apoptosis in COCs were measured. By using follicular aspiration, significantly higher percentages in the oocyte nuclear maturation were obtained. However this technique was restricted to large antral follicles and allowed to recover lower amounts of oocytes per ovary than the slicing method. In addition, apoptosis in porcine COCs would not be related to the collection methods used.

Key words: porcine COCs, apoptosis, slicing, follicular aspiration.

INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* de embriones (PIV) ha cobrado mayor relevancia en el último tiempo debido, principalmente, al desarrollo de nuevas biotecnologías como la clonación y la transgénesis^{9, 10}. La técnica de obtención de los ovocitos parecería influir en la calidad de los mismos; constituyéndose como uno de los factores determinantes para el éxito de la PIV.

Los ovarios de faena constituyen la principal fuente de ovocitos para las diferentes biotecnologías reproductivas. Las técnicas habitualmente utilizadas son: aspiración folicular, disección folicular y el *slicing* (cortes de la superficie ovárica). La aspiración folicular permite punzar, solamente, folículos antrales mayores a 3 mm, claramente visibles en la superficie ovárica de hembras adultas; durante el proceso se pierden células del *cumulus* y la cantidad de COC recuperados es menor que con otras técnicas². Por otro lado, mediante la técnica de *slicing* se recuperan gran cantidad de COC por ovario, pero la población ovocitaria resulta muy heterogénea y es por eso que debe hacerse una estricta selección de los COC. Sin embargo, esta técnica es la más utilizada para recuperar ovocitos de ovarios de hembras prepúberes, ya que en este caso el tamaño folicular dificulta la punción². En la especie caprina, Romaguera *et al.*¹⁹ determinaron que la recuperación de ovocitos por *slicing*, respecto a la

aspiración folicular, disminuye significativamente los porcentajes de apoptosis temprana y tardía en los COC inmaduros. Por su parte, Martino *et al.*¹⁷ refieren que por la técnica de *slicing* se obtuvieron más ovocitos por ovario que por las técnicas de disección o aspiración.

Diversos trabajos correlacionan las características morfológicas de los COC con la calidad ovocitaria y la competencia para el desarrollo embrionario; la presencia de un *cumulus* compacto con varias capas de células alrededor del ovocito, influye positivamente en la maduración ovocitaria⁶. Anguita *et al.*⁴, observaron, en bovinos, un incremento del potencial de desarrollo embrionario junto con el aumento en el diámetro de los ovocitos.

En numerosos estudios se han buscado marcadores que puedan evidenciar la calidad de los ovocitos² entre ellos se encuentra la apoptosis^{5, 8, 16, 18}. La evaluación de dicho proceso puede ser utilizada como indicador de calidad ovocitaria, ya que en el desarrollo folicular normal, aquellos folículos que no llegan a madurar, degeneran en un proceso conocido como atresia, fenómeno caracterizado por la apoptosis, en primer lugar de las células granulosas murales¹³, luego del ovocito y de las células del *cumulus*^{2, 7, 12, 14, 20, 22, 24}. La apoptosis no es un fenómeno restringido a los folículos atrésicos; existe un cierto número de células foliculares apoptóticas también en folículos sanos¹⁴. Sin embargo, alcanzado un

cierto nivel umbral de células apoptóticas en el folículo, el ovocito se ve afectado^{11, 14, 27}.

Si bien la técnica de aspiración folicular y el *slicing* se utilizan en la PIV de embriones porcinos, hasta el momento de la realización de este trabajo, no se ha verificado en la bibliografía una comparación entre ambas técnicas y en esta especie. Todo esto motivó el objetivo del presente trabajo que consistió en evaluar la calidad de los complejos *cumulus* ovocito porcinos obtenidos por las técnicas de *slicing* y aspiración folicular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de complejos ovocito-*cumulus*

Los ovarios de cerdas provenientes del frigorífico fueron trasladados al laboratorio dentro de las 3 horas posteriores a la faena, manteniendo su temperatura entre 28-33°C, fueron lavados con NaCl 0,9% a 37°C. En el método de aspiración, los COC se obtuvieron por punción y aspiración de folículos de 3-8 mm con jeringa de 10 mL y aguja 18 G. En el *slicing* se realizaron cortes longitudinales sucesivos de la superficie ovárica con bisturí, recuperando los COC del medio donde se encontraban sumergidos los ovarios: 1 mg/mL de polivinilalcohol (PVA) en buffer fosfato (PBS). Los COC se lavaron con PVA - PBS y se clasificaron, bajo lupa estereoscópica según la apariencia del *cumulus* y del ooplasma, en 6 categorías¹ como muestra la figura 1. Se utilizó un n total de 1030 COC.

Maduración *in vitro* (MIV)

Los COC pertenecientes a las categorías A1, A2 y B1 fueron utilizados para la maduración *in vitro*, mientras que los de las categorías B2, C y D fueron descartados para esta experiencia por los bajos porcentajes de maduración obtenidos en estudios previos de nuestro laboratorio (datos no publicados). Grupos de 50 COC se colocaron en gotas de 500 µL de medio de cultivo TCM 199 suplementado con 10% fluido folicular porcino, 50 mg/L de gentamicina, 0.5 mg/L de FSH porcina y 0.5 mg/L de LH porcina (Sigma Chemical Company, St.Louis, MO, USA) Las gotas se cubrieron con aceite mineral y permanecieron a 39°C, en atmósfera saturada de humedad con 5% CO₂. La MIV se llevó a cabo durante 44 – 48 h.

Evaluación de la maduración nuclear ovocitaria

Los COC fueron desnudados con hialuronidasa (Sigma Chemical Company, St.Louis, MO, USA) 3000 µg/ml¹⁵ y agitación en vortex, centrifugados a 2000 rpm durante 20 minutos, fijados con glutaraldeído al 0,5%, teñidos con Hoechst 33342 (Invitrogen®) y montados para su observación con microscopio de fluorescencia trilocular LEICA DM4000B LED® y cámara LEICA DCC-380X® con soporte digital para captura de imágenes LASZ LEICA Inc®, utilizando filtro de excitación: 410 nm. Aquellos ovocitos que se encontraban en estadio de metafase II fueron considerados maduros.

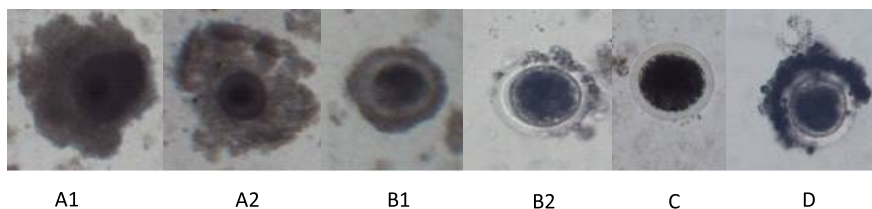


Figura 1. COCs en fresco sin teñir x40. A1: ovocitos rodeados por un *cumulus* íntegro, denso y oscuro. A2: ovocitos rodeados por un *cumulus* íntegro, denso y claro. B1: ovocitos rodeados de forma continua por 1 o 2 capas de células del *cumulus*. B2: ovocitos con 1 o 2 capas de células del *cumulus* dispuestos de forma discontinua. C: ovocitos totalmente desnudos. D: ovocitos rodeados por un *cumulus* de células picnóticas.

Evaluación de apoptosis temprana: tinción anexina V-FITC – yoduro de propidio (IP)

Los COC previamente clasificados fueron sometidos a la tinción con anexina V durante 15 minutos a temperatura ambiente, según protocolo (Invitrogen®). Se utilizó como contraste la tinción con IP 10 µg/mL. Las muestras se montaron para ser observadas en microscopio de fluorescencia trilocular LEICA DM4000B LED* y cámara LEICA DCC-380X* con soporte digital para captura de imágenes LASZ LEICA Inc*, filtro de emisión: 617 nm (ip) 518 nm (anexina V), filtro de excitación: 488-535 nm. Se determinó el porcentaje de ovocitos anexina V positivos (fluorescencia verde, ovocitos con apoptosis temprana) y de IP positivos (fluorescencia roja, ovocitos muertos) de cada categoría obtenidos por ambas técnicas. Por otra parte, según el porcentaje de células del *cumulus* positivas a anexina V, cada uno de los COC quedó incluido en uno de los siguientes intervalos: [0-25%), [25-50%), [50-75%) y [75-100%).

Evaluación de apoptosis tardía: ensayo TUNEL (Tdt-mediated dUTP nick-end labeling)

Los COCs se fijaron con paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron con Tritón X100 al 0,5% en citrato de sodio al 0,1%. Los controles (+) y (-) se incubaron con ADNasa 0.1 U/µL¹⁵. Todos fueron sometidos a la reacción TUNEL, según protocolo (In Situ Cell Death Detection Kit 1684795 Roche®). Se utilizó IP (10µg/ml) como tinción de contraste y las muestras se montaron para ser observadas con microscopio de fluorescencia. En cada COC se evaluó al ovocito y a las células del *cumulus*, siendo la cantidad de células TUNEL positivas relativizadas al área promedio de cada categoría.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el software Infostat (versión 2013e). Para analizar los porcentajes de maduración se realizó una comparación de proporciones. En el caso de la distribución de apoptosis, según las categorías y las técnicas de obtención, se

utilizó un ANOVA de dos factores. Este análisis se profundizó con Test de Independencia y Regresión. Se determinaron diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$.

RESULTADOS

Rendimiento de las técnicas de obtención de COC

La cantidad de COC recuperados fue dependiente de la técnica utilizada. Se obtuvieron en promedio 12 COC/ovario mediante la técnica de aspiración y 26 COC/ovario por *slicing*. Por otra parte, la proporción de las diferentes categorías morfológicas de COC encontradas no difirió según la técnica de obtención empleada ($p \approx 0$).

Distribución de la apoptosis temprana y tardía en ovocitos

Se verificó la presencia de apoptosis temprana en ovocitos de todas las categorías obtenidos por ambas técnicas (figura 2). Tanto por *slicing* ($p = 0,0242$) como por aspiración ($p = 0,0036$), el porcentaje de ovocitos anexina V positivos incrementó a medida que disminuyó la calidad observada bajo lupa estereoscópica (excluyendo la categoría D, gráfico 1). Comparando ambas técnicas de obtención, observamos que no existieron diferencias significativas en los porcentajes de ovocitos que presentaron apoptosis temprana. No se observó apoptosis tardía en los ovocitos.

Distribución de la apoptosis temprana y tardía en células del *cumulus*

Se comprobó la existencia de apoptosis temprana y tardía en células del *cumulus* en todas las categorías de COC (tablas 1 y 2, figura 3). Sin embargo, al comparar ambas técnicas de obtención, no se observaron diferencias significativas en la distribución de la apoptosis temprana. Casi la totalidad de los COC pertenecientes a las categorías consideradas de mejor calidad, en virtud de su evaluación morfológica (A1, A2 y B1), presentaron hasta en 25% de células del *cumulus* con apoptosis temprana (tabla 1). La cantidad de células del

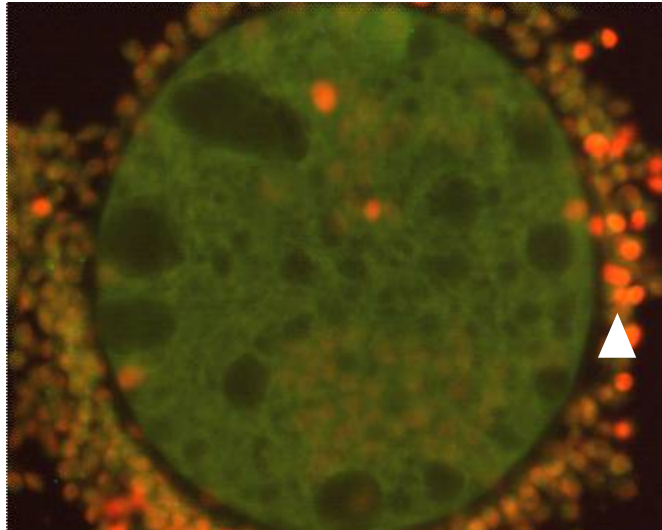


Figura 2. Ovocito Anexina V positivo, rodeado de células del *cumulus* Anexina V e IP positivas (flecha) x400.

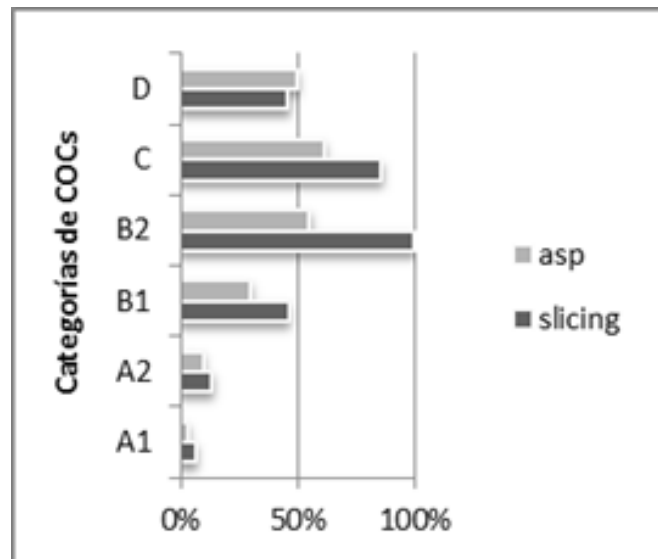


Gráfico 1. Porcentaje de ovocitos Anexina V positivos según la categoría de COCs, obtenidos por aspiración (n= 363) y *slicing* (n= 241)

cumulus con apoptosis tardía fue mayor en aquellos COC recuperados por aspiración ($p=0,002$), mientras que al evaluar la cantidad de células positivas relativas al área de cada COC, no se encontraron diferencias significativas, probablemente debido a que los COC obtenidos por *slicing* tenían una menor superficie (tabla 2). Por otra parte, en COC obtenidos por ambos métodos se evidenció un aumento del número de células del *cumulus* sufriendo

apoptosis tardía al disminuir la calidad evaluada morfológicamente, excluyendo la categoría C ($p \approx 0$), como se muestra en gráfico 2.

Se evidenciaron ovocitos y células del *cumulus* IP (+) (apoptosis tardía/muerte) independientemente de la categoría y de la técnica por la cual fueron obtenidos los COC.

Maduración nuclear ovocitaria

Al comparar el porcentaje de maduración

nuclear, se evidenciaron diferencias significativas entre ambas técnicas de obtención ($p= 0,016$). Los COC obtenidos por la técnica de aspiración folicular presentaron un 57,5% de ovocitos maduros y los obtenidos por *slicing* un 33,3% (gráfico 3).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó la influencia de la técnica de obtención en la calidad de los COC porcinos, medida a través de la evaluación de apoptosis y los porcentajes de maduración

Tabla 1. Porcentaje de células del cumulus Anexina V positivas según categoría de COC y técnica de obtención. n=363 aspiración y n= 241 slicing.

Categoría	Porcentaje de células del cumulus ANEXINA V positivas				Aspiración			
	Slicing	0-25%	25-50%	50-75%	75-100%	0-25%	25-50%	50-75%
A1	100%	0%	0%	0%	97%	2%	0%	2%
A2	100%	0%	0%	0%	95%	5%	0%	0%
B1	100%	0%	0%	0%	83%	14%	2%	0%
B2	68%	6%	26%	0%	83%	9%	9%	0%
C	100%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%
D	69%	15%	15%	0%	68%	14%	5%	14%

Tabla 2. Distribución de apoptosis tardía según ensayo TUNEL en células del cumulus según categoría de COCs y técnica de obtención. n= 178 aspiración y n= 142 slicing.

Categoría	Nº cel. cumulus TUNEL positivas		Área de COCs en μm^2		Nº cel. cumulus TUNEL positivas/área en μm^2	
	Slicing	Aspiración.	Slicing	Aspiración	Slicing	Aspiración
A1	2,96875	6,46153846	193146,196	652138,1	2,8237E-05	1,9008E-05
A2	2,65625	9,03636364	96615,2344	120155,964	3,7909E-05	0,0001262
B1	10,88	12,3278689	39027,2568	35748,4092	0,00029386	0,00039123
B2	13,5	18,0555556	25730,9031	31871,0122	0,0005304	0,00066923
D	39,5	28,2857143	56989,4733	55546,9386	0,00078305	0,00051531

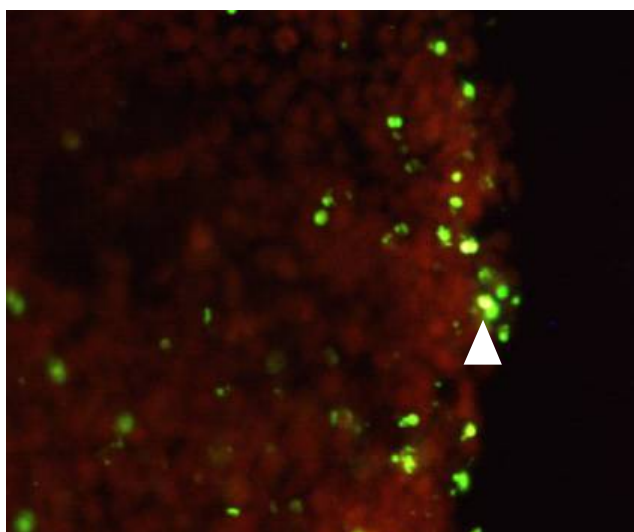


Figura 3. Células del cumulus TUNEL positivas (flecha) x400.

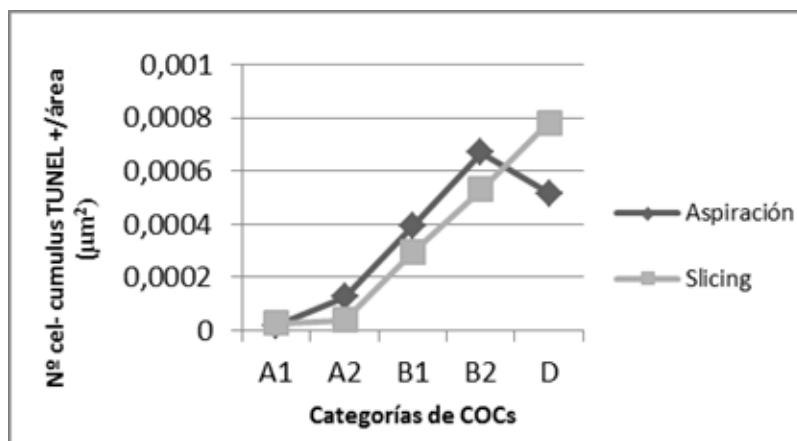


Gráfico 2. N° cel *cumulus* TUNEL positivas/área promedio en las diferentes categorías de COC, obtenidos por aspiración (n=178) y *slicing* (n= 142)

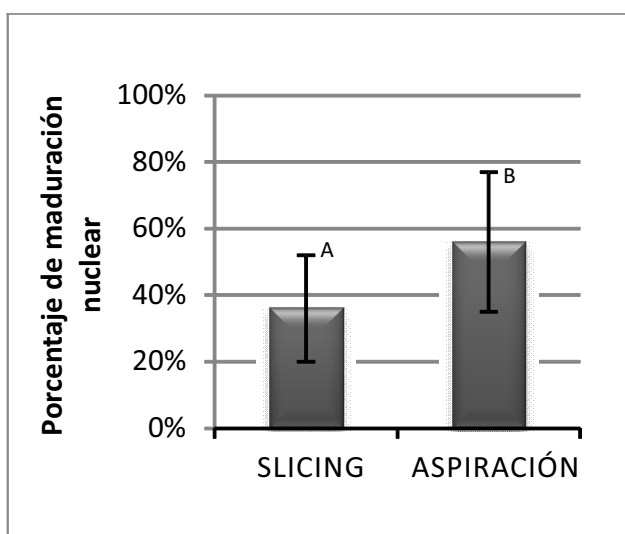


Gráfico 3. Porcentaje de maduración nuclear de ovocitos obtenidos por *slicing* y aspiración. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas p= 0,016 n= 106

obtenidos *in vitro*. La técnica de *slicing* permitió aprovechar mejor los ovarios de hembras prepúberes, ya que estos presentaron folículos de menor tamaño que no pudieron ser utilizados con el método de aspiración folicular. Además, coincidiendo con lo observado por Martino *et al* en cabras¹⁷, el *slicing* resultó ser una técnica más rápida obteniéndose mayor cantidad de COC por ovario.

Coincidiendo con lo observado por Anguita *et al.* 2008, al utilizarse folículos no antrales, o antrales pequeños, la calidad de los ovocitos

resultó variable y muchos de ellos no fueron competentes para poder desarrollarse *in vitro*². Estudios realizados en numerosas especies han determinado que el diámetro de un ovocito está relacionado con el tamaño del folículo que lo contiene y que este, a su vez, se correlaciona con la competencia meiótica del ovocito²; también se ha observado un incremento del potencial de desarrollo embrionario junto con el aumento en el diámetro de los ovocitos⁴. Es evidente entonces que estos factores repercuten en el éxito de las diferentes tecnologías reproductivas,

y en este trabajo, se vio reflejado en el menor porcentaje de maduración nuclear alcanzado en aquellos ovocitos obtenidos por *slicing*. No serían las características propias de la técnica, sino los COC que se obtienen con la misma los que determinan los menores porcentajes de maduración hallados. Por otro lado, la técnica de aspiración folicular permitió la selección de los folículos a aspirar, evitando la punción de vasos, folículos hemorrágicos, degenerados o excesivamente grandes. Como consecuencia, se recuperó un líquido folicular más limpio, lo cual facilitó la tarea de recolección y clasificación de COC. Además, el tamaño del folículo a punzar permitió obtener COC cuyos ovocitos poseerían mayores posibilidades de desarrollo². Posiblemente, este hecho incidiera en los resultados, obteniéndose un mayor porcentaje de maduración *in vitro*, al utilizar esta técnica.

En referencia a la apoptosis de los COC porcinos, los resultados obtenidos al comparar ambas técnicas de obtención no coinciden con lo observado por Romaguera *et al.* en caprinos¹⁹. Los ovocitos que se utilizan para tecnologías reproductivas *in vitro* constituyen una población variada, con diferentes estadios de crecimiento y de atresia⁴. Coincidiendo con lo observado en otras especies no se detectó apoptosis tardía en ovocitos inmaduros porcinos, sin embargo en todas las categorías un cierto porcentaje estaba sufriendo apoptosis temprana^{15, 26}. En las células del *cumulus* se comprobó la existencia de apoptosis temprana y tardía, incluso en los COC de mejor morfología^{3, 4, 25}. Este hecho podría deberse al grado de atresia que se encuentra normalmente en los folículos^{2, 7, 14, 20, 22, 24}, como así también al estrés generado durante el transporte, la extracción de los COC y la producción de radicales libres derivados del oxígeno^{21, 25}. Por estos motivos, la apoptosis del *cumulus* no podría ser tomada como indicador de la competencia meiótica del ovocito²³. Asimismo, la forma de evaluar y/o cuantificar dicho proceso, difiere en la bibliografía de referencia. Esto no permite una comparación exacta entre los resultados obtenidos por los diferentes laboratorios. En este

trabajo, se observó un aumento de la apoptosis temprana en ovocitos y tardía en *cumulus* a medida que disminuye la calidad evaluada morfológicamente.

Se verificó la presencia de ovocitos y células del *cumulus* IP (+) (necrosis/apoptosis tardía) independientemente de la técnica de obtención y de la categoría de los COC. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Alvarez *et al.*¹ quienes evaluaron viabilidad en ovocitos porcinos mediante diacetato de fluoresceína y azul tripán. La independencia de estas variables, hace que este hecho pueda explicarse por la muerte inducida, dado el tiempo transcurrido y/o las condiciones de recolección y clasificación de los COC.

CONCLUSIONES

La técnica de *slicing* permitió aprovechar mejor los ovarios de hembras prepúberes, obteniendo mayor cantidad de COC por ovario; los porcentajes de maduración nuclear fueron notablemente menores que para los COC obtenidos por el método de aspiración. Es por esto que mientras el tamaño folicular lo permita, se recomienda el uso de la aspiración folicular. Según los resultados obtenidos, la apoptosis en los COC porcinos no estaría relacionada con el método de recuperación utilizado. Dada la importancia creciente de los modelos porcinos en la investigación biomédica, estos resultados podrían contribuir en la mejora del desarrollo de tecnologías reproductivas *in vitro* en esta especie.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez, GM.; Dalvit, GC; Achi, MV; Míguez, MS.; Cética, PD. Immature oocyte quality and maturational competence of porcine cumulus-oocyte complexes subpopulations. *Biocell* 2009; Vol. 33, pp. 166-177.
2. Anguita Bustamante, Begoña. Tesis doctoral: Estudio molecular y de apoptosis en ovocitos de cabras prepúberes y su relación con el desarrollo embrionario. Unidad de Producción Animal del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma. Barcelona, España. 2008.

3. Anguita, B.; Paramio, MT.; Morató, R.; Romaguera, R.; Jimenez Macedo, AR; Mogas, T. et al. Effect of the apoptosis rate observed in oocytes and cumulus cells on embryo development in prepubertal goats. *Animal Reproduction Science*, 2009; Vol. 116 (1-2); pp. 95-106
4. Anguita, B.; Vandaele, L.; Mateusen, B.; Maes, D.; Van Soom, A. Developmental competence of bovine oocyte is not related to apoptosis incidence in oocytes, cumulus cells and blastocysts. *Theriogenology* 2007; Vol. 67; pp.537-49.
5. Asselin, E.; Xiao, CW.; Wang, YF.; Tsang, BK. Mammalian follicular development and atresia: role of apoptosis. *Biol. Signal Recept* 2000; Vol. 9, pp. 87- 95
6. De los Reyes, M., Aguayo, JP., Del Campo, H., Barros, C. Evaluación de ovocitos de vaca para la maduración en cultivo. *Avances en Ciencias Veterinarias* 1999; Vol. 14; pp. 42-53.
7. Driancourt, MA, Locatelli, A and Prunier, A. Effects of gonadotrophin deprivation on follicular growth in gilts. *Reproduction, Nutrition and Development* 1995; Vol. 35, pp. 663-73.
8. Escobar, María Luisa. Apoptosis. Cell Death in mammalian ovary. México D.F. Springer, 2011, Vol 4, pp. 63-80.
9. Gil, MA.; Cuello, C.; Parrilla, I.; Vazquez, J.; Roca, J.; Martinez, EA. Advance in swine *in vitro* embryo production technologies. *Reproduction in Domestic Animals* 2010; Vol. 45 (2)
10. Grupen, CG. The evolution of porcine embryo in vitro production. *Theriogenology* 2014; Vol. 81 (1)
11. Grupen, CG.; Armstrong, DT. Relationship between cumulus cell apoptosis, progesterone production and porcine oocyte developmental competence: temporal effects of follicular fluid during IVM. *Reproduction, Fertility and Development* 2010; Vol. 22 (7)
12. Hirsfield, AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *International review of Cytology* 1991; Vol. 124, pp. 43-101.
13. Hughes FM.; Gorospe WC. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cell: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia.. s.l. : Endocrinology, 1991, Endocrinology, Vol. 129, pp. 2415-2422. pag 2415-2422.
14. Janowski, D.; Tomeka, W.; Salilew-Wondimib ,D.; El-Sayedc, A.; Tornera , H.; Tesfayeb , D. et al. Incidence of apoptosis and transcript abundance in bovine follicular cells is associated with the quality of the enclosed oocytes. *Theriogenology* 2012; Vol. 78. pp 656-669.
15. Li, H.; Liu, DJ.; Cang, M.; Wang, LM.; Jin, M.; Ma, Y. et al Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. *Animal Reproduction Science* 2008; Vol. 114. pp. 89-98
16. Manabe, N, Goto, Y and Matsuda-Minehata, F et al. Regulation Mechanism of selective atresia in porcine follicles: Regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. *Journal of Reproduction and Development* 2004; Vol. 50 pp. 493-514.
17. Martino A., Palomo JM, Mogas T. Influence of the collection technique of prepuberal goats on *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology* 1994; Vol. 42. Pp 859-873.
18. Mora, Nancy Judith. Fenómenos mitocondriales y nucleares relacionados con la resistencia a la apoptosis. Importancia del estrés oxidativo. Servei de Publicacions, Departament de Fisiologia, Universitat de Valencia, España. 2009; pp 1-225
19. Romaguera R, Casanovas A, Morató R, Izquierdo D, Catalá M, Jiménez-Macedo AR, et al. Effect of follicle diameter on oocyte apoptosis, embryo development and chromosomal ploidy in prepubertal goats. *Theriogenology* 2010; Vol. 10
20. Sang, HK.; Kwam, SM.; Nam, HK. Differential Expression of Programmed Cell Death on the Follicular Development in Normal and Miniature Pig Ovary. *Plos one* 2012; Vol. 7.
21. Tatemoto, H.; Noriaki, S.; Muto, N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused

- by oxidative stress during in vitro maturation: role of cumulus cells. *Biology of Reproduction* 2000; Vol. 63. pp 805-810.
22. Tilly, J.L.; Kowalski, K.I.; Johnson, A.L. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 1991; Vol. 129; pp. 2799-801
23. Warzych, E.; Pers-Kamczyc, E.; Krzywak, A.; Dudzinska, S.; Lechniak. Apoptotic index within cumulus cells is a questionable marker of meiotic competence of bovine oocytes matured in vitro. *Reproductive Biology* 2013; Vol. 13.
24. Yang, M.Y.; Rajamahendran, R. Morphological and Biochemical Identification of Apoptosis in Small, Medium, and Large Bovine Follicles and the Effects of Follicle-Stimulating Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I on Spontaneous Apoptosis in Cultured Bovine Granulosa Cells. *Biology of Reproduction* 2000; Vol. 62, pp. 1209–1217.
25. Yuan, Y.Q.; Van Soom, A.; Leroy, J.L.M.R.; Dewulfa, J.; Van Zeverenb, A.; de Kruif, A. et al. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology* 2005; Vol. 63, pp. 2147-2163.
26. Yuan, Y.; Wheeler, M.B.; Krisher, R.L. Disrupted redox homeostasis and aberrant redox gene expression in porcine oocytes contribute to decreased developmental competence. *Biology of Reproduction* 2012; Vol. 87.
27. Zeuner, A.; Müller, K.; Reguzynki, K.; Jewgenow, C. Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during in vitro maturation. *Theriogenology* 2003; Vol. 59; pp. 1421-1433.