

Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos

Concepción Ahuja Aguirre^{1*}, Felipe Montiel Palacios², Ponciano Pérez Hernández¹
y Jaime Gallegos Sánchez³

¹Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz. Carretera Federal Xalapa-Veracruz, C.P. 91700, Tepetates, Veracruz. México.

*Correo electrónico: ahuja@colpos.mx

²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. Veracruz, Veracruz. México.

³Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Montecillo, México. México.

RESUMEN

Se evaluó la tasa de desarrollo de blastocistos bovinos producidos *in vitro* utilizando medio de cultivo convencional para embriones bovinos y medio de cultivo para producción *in vitro* (PIV) de embriones humanos. Se obtuvieron ovocitos de ovarios de vacas Cebú sacrificadas en matadero. Los folículos ováricos fueron aspirados y los complejos *cumulus*-ovocitos (CCO) con al menos dos capas de células del *cumulus* intactas fueron madurados durante 22 a 24 h. Posteriormente, los CCO fueron fertilizados con semen bovino descongelado y coincubados por 20 a 24 h. Los presuntos cigotos fueron cultivados por 48 h en medio KSOM o en medio HTF modificado. En los días 3 y 5 post-fertilización *in vitro* (FIV), los embriones fueron cambiados a gotas nuevas de KSOM o de IVC-Two/IVC-Three. Para ambos cultivos, en el día 3 post-FIV se determinó la tasa de división y entre los 7 a 9 días post-FIV, se evaluó el desarrollo embrionario a etapa de blastocisto. La tasa de maduración *in vitro* fue 89,7%. La tasa de división fue 82,3% para ovocitos cultivados en KSOM y de 80,1% para ovocitos cultivados en HTF (P>0,05). La tasa de desarrollo de blastocistos fue 31,6% para embriones cultivados en KSOM y 29,5% para embriones cultivados en HTF/IVC-Two/IVC-Three (P>0,05). En conclusión, las tasas de desarrollo *in vitro* de blastocistos bovinos fueron similares para los embriones cultivados en un medio convencional para PIV de embriones bovinos y para los embriones cultivados en medios utilizados para PIV de embriones humanos, por lo que ambos tipos de medios pueden utilizarse para la PIV de embriones bovinos con resultados aceptables.

Palabras clave: Blastocisto, bovino, embrión, producción *in vitro*.

Alternative medium for *in vitro* production of bovine embryos

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the blastocyst development rate for *in vitro* produced bovine embryos using either the conventional culture medium for bovine embryos or culture media used for the *in vitro* production (IVP) of human embryos. Oocytes were obtained from ovaries of slaughtered Zebu cows. Ovarian follicles were aspirated and the cumulus-oocytes complexes (COC) with at least two layers of intact cumulus cells were matured for 22 to 24 h. Following that, COC were fertilized with frozen-thawed bovine semen and coincubated for 20 to 24 h. The presumptive zygotes were cultured for 48 h in KSOM medium or modified HTF medium. On days 3 and 5, post-*in vitro* fertilization (IVF) embryos were placed into new drops of KSOM or IVC-Two/IVC-Three. For both culture types, the cleavage rate was determined on day 3 post-IVF and the embryo development rate to blastocyst stage was evaluated on days 7 to 9 post-IVF. *In vitro* maturation rate was 89.7%. Cleavage rate was 82.3% for oocytes cultured in KSOM and 80.1% for oocytes cultured in HTF (P>0.05). Blastocyst development rate was 31.6% for embryos cultured in KSOM and 29.5% for embryos cultured in HTF/IVC-Two/IVC-Three (P>0.05). In conclusion, *in vitro* blastocyst development rates were similar for both the embryos cultured in the conventional medium for IVP of bovine embryos and the embryos cultured in media used for the IVP of human embryos, thus, both types of media can be used for the IVP of bovine blastocysts with acceptable results.

Keywords: Blastocyst, bovine, embryo, *in vitro* production.

INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* (PIV) de embriones bovinos ha adquirido importancia para ser usada como alternativa o en combinación con programas de ovulación múltiple y transferencia de embriones debido a sus ventajas y flexibilidad (Galli *et al.*, 2001). El proceso de PIV de embriones bovinos se divide en cuatro etapas: la maduración de ovocitos, la capacitación espermática, la fertilización de ovocitos maduros y el cultivo de embriones. Estas etapas comprenden una serie de procesos fisiológicos, cada uno de los cuales condiciona el éxito o fracaso del proceso (Mucci *et al.*, 2006). El parámetro más usado para medir la eficacia de la PIV de embriones es la tasa alcanzada de blastocistos (Kubisch *et al.*, 2001).

Aunque las tasas de maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos bovinos son altas (aproximadamente 90 y 80%, respectivamente), la mayoría de los ovocitos fertilizados sólo se dividen hasta la etapa de 2 a 4 células y no todos son capaces de alcanzar la etapa de blastocisto (Lonergan *et al.*, 1999; Rizos *et al.*, 2002). La tasa de desarrollo de blastocistos *in vitro* oscila entre 30 y 40% (Marquant Le Guenne *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2001; Blondin *et al.*, 2002; Lonergan *et al.*, 2003a). Esto indica que el cultivo embrionario desde cigoto hasta blastocisto es crítico para la PIV de embriones, además que durante este período se define en gran medida, la calidad de los embriones obtenidos (Rizos *et al.*, 2002; Galli *et al.*, 2003; Lonergan *et al.*, 2003b; Lonergan *et al.*, 2004).

Mientras el número de blastocistos PIV depende principalmente de la calidad de los ovocitos recuperados, la calidad de los blastocistos está determinada por el ambiente de cultivo y fertilización de los ovocitos (Calado *et al.*, 2001; Holm *et al.*, 2002; Rizos *et al.*, 2002). Durante el cultivo embrionario *in vitro* ocurren cuatro eventos importantes en lo que se refiere al desarrollo desde la etapa de cigoto hasta la formación del blastocisto: la primera división embrionaria, cuyo momento de presentación es crítico para el subsecuente desarrollo del embrión (Lonergan *et al.*, 1999), la activación del genoma embrionario en la etapa de 8 a 16 células (Memili y First, 2000), la compactación de la mórula en el día cinco (Boni *et al.*, 1999) y la formación del blastocisto a los días seis ó siete (Watson, 1992). Por lo tanto, las condiciones inadecuadas del ambiente de cultivo que pudieran afectar alguno o todos estos eventos podrían tener

un efecto deletéreo sobre la calidad del embrión (Lonergan *et al.*, 2003b).

Entre los medios más usados para el cultivo *in vitro* de embriones bovinos cabe mencionar: el medio Charles Rosenkrans (CR1) (Rosenkrans y First, 1994), el fluido oviductal sintético (SOF) (Gardner *et al.*, 1994; Holm *et al.*, 1999) y el medio optimizado simple de potasio (KSOM) (Liu y Foote, 1995). En México, en ocasiones resulta complicado conseguir medios para la PIV de embriones bovinos porque deben ser importados directamente de los laboratorios que los producen. Esto resulta en largos períodos de espera e inadecuado almacenamiento de los medios durante el transporte, lo que provoca que los medios no sean aptos para ser usados en el laboratorio, elevando el costo de los embriones producidos. Sin embargo, dado el auge que ha tenido en el país la reproducción asistida en humanos, generalmente resulta más fácil y menos costoso conseguir medios utilizados para la PIV de embriones humanos, que aunque deben ser igualmente importados, se consiguen con compañías distribuidoras nacionales. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar las tasas de desarrollo de blastocistos bovinos producidos *in vitro* utilizando un medio de cultivo convencional para PIV de embriones bovinos y medios de cultivo empleados para la PIV de embriones humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los embriones fueron producidos según el protocolo descrito por Rivera *et al.* (2004), con excepción de que se utilizaron algunos medios diferentes a los mencionados por dichos autores. La solución Tyrode Modificada (Modified Tyrode solution) usada para preparar las soluciones TALP (Tyrode albumin lactate pyruvate) IVF-TALP y Sp (Sperm)-TALP, de acuerdo con Rivera *et al.* (2004), así como el medio optimizado simple de potasio (potassium simplex optimized medium; KSOM) fueron adquiridos de Caisson Laboratories Inc. (North Logan, EUA). Los medios fluido oviductal humano (HTF) modificado con y sin HEPES y con antibióticos (penicilina-estreptomina 100 y 50 µg/mL) fueron obtenidos de In Vitro S.A. (Ciudad de México, México). La hormona foliculo estimulante (FSH; Folltropin®-V) fue obtenida de Bioniche Animal Health (Ontario, Canada). Los medios IVC-Two™ (InVitroCare®; bajo en glucosa, libre de fosfato, formulado con EDTA, taurina y glutatión y adicionado con glutamina estabilizada),

IVC-Three™ (InVitroCare®; libre de fosfato, con elevados niveles de glucosa, suplementado con aminoácidos esenciales y no esenciales, formulado con EDTA, glutatión y glutamina estabilizada) y la albúmina sérica humana (HSA) fueron adquiridos de InVitroCare, Inc. (Frederick, EUA). Se extrajo sangre de un bovino castrado para la obtención de suero de novillo, el cual fue procesado para desnaturalizar las proteínas y hacerlo apto para su uso en cultivo embrionario. Los demás reactivos fueron adquiridos de Sigma Aldrich Química (Toluca, México). El proceso de maduración, fertilización y cultivo de los embriones se realizó en una incubadora a una temperatura de 38.5°C en atmósfera de 5% de CO₂ en aire húmedo.

Colección y maduración *in vitro* de ovocitos

Los ovarios fueron obtenidos de vacas Cebú sacrificadas en matadero. Inmediatamente después de su colección, los ovarios fueron colocados en un recipiente térmico con 1 L de solución salina estéril (0.9% [p/v] de NaCl) a 35-36°C suplementada con 100 UI/mL de penicilina G sódica y 1 mg/mL de estreptomina. Al finalizar la colección, los ovarios fueron enjuagados para eliminar la sangre y fueron transferidos a otro recipiente térmico con nueva solución salina con penicilina/estreptomina (35-36°C), donde fueron conservados para ser transportados al laboratorio (2 a 3 h después de su colección). Al llegar al laboratorio, los ovarios fueron lavados en solución salina a 38,5°C. Los CCO de los folículos ováricos de 3 a 7 mm de diámetro fueron aspirados con una aguja hipodérmica estéril calibre 18 unida a una jeringa desechable de 10 mL. El fluido folicular conteniendo los CCO fue transferido a una placa de Petri para seleccionar, bajo el estereomicroscopio (Leica Zoom 2000), sólo los ovocitos con al menos dos capas de células del *cumulus* intactas y con citoplasma granulado homogéneo. Los CCO seleccionados fueron colocados en el primer compartimiento de una placa de Petri de cuatro compartimientos (X-Plate™, BD Falcon™) conteniendo medio HTF-Hepes modificado con antibióticos (buffer HEPES 21 mM, bicarbonato de sodio 4 mM, sin albúmina humana fracción V, penicilina-estreptomina 100 UI/mL y 50 µg/mL). Los CCO fueron lavados dos veces transfiriéndolos entre los compartimientos restantes de la placa. Posteriormente, los CCO fueron transferidos a una placa de Petri conteniendo medio

de maduración de ovocitos (MMO) contentivo de HTF modificado con antibióticos (bicarbonato de sodio 25 mM, sin albúmina humana fracción V, penicilina-estreptomina 100 UI/mL y 50 µg/mL), suplementado con 10% (v/v) de suero de novillo (SN), 50 mg/mL de gentamicina, 20 mg/mL de FSH (Folltropin®-V), 1 mg/mL de estradiol, 0,2 mM de piruvato de sodio y 15 mg/mL de L-glutamina para un lavado final. Grupos de 10 a 20 CCO fueron transferidos a gotas de 50 µL de MMO cubiertas con aceite mineral, y fueron incubados durante 22 a 24 h. Cumplido este tiempo, la maduración de los ovocitos se determinó al evaluar el grado de expansión de las células del *cumulus* con un estereomicroscopio.

Preparación del semen y fertilización *in vitro* (FIV)

Después de la maduración, los CCO fueron removidos de las gotas de maduración y lavados una vez en HTF-Hepes modificado con antibióticos y en IVF-TALP. Grupos de 20 a 30 CCO fueron transferidos a cada pozo de placas de cuatro pozos conteniendo 600 µL de IVF-TALP por pozo. Se descongelaron dos pajuelas de semen de dos diferentes toros de raza Holstein y el semen fue lavado por centrifugación mediante un gradiente de Percoll® (45%/90% [v/v]) a 1000 g por 10 min. El pellet de espermatozoides fue recuperado del fondo del tubo, diluido con 10 mL de Sp-TALP y centrifugado a 200 x g por 5 min. El sobrenadante fue desechado y el pellet fue resuspendido en 100 µL de IVF-TALP para obtener una concentración espermática de 2 x 10⁶ espermatozoides/mL. A cada pozo conteniendo CCO maduros e IVF-TALP se le agregaron 25 µL de suspensión de espermatozoides (para una concentración final de 1 x 10⁶ espermatozoides/mL) y 25 µL de PHE (2 mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina y 250 mM de epinefrina en 0.9% [p/v] de NaCl). Los ovocitos y los espermatozoides fueron coincubados por 20 a 24 h.

Cultivo embrionario

Finalizado el período de incubación, los presuntos cigotos fueron removidos de los pozos de la placa de fertilización y denudados de las células del *cumulus* mediante aspiración repetida utilizando para ello, una pipeta con punta de 135 µm de diámetro. Los ovocitos libres de células del *cumulus* fueron lavados dos veces en HTF-Hepes modificado y fueron entonces

asignados para el cultivo en KSOM (Rivera *et al.*, 2004) o para el cultivo en medios utilizados para PIV de embriones humanos. El cultivo con KSOM se hizo de la siguiente manera: los presuntos cigotos se lavaron una vez en KSOM y fueron colocados en grupos de 20 a 30 en gotas de 50 μ L de KSOM suplementado con 3 mg/mL de albúmina sérica bovina esencialmente libre de ácidos grasos (EFAF-BSA), 0,5 μ g/mL de gentamicina y 25 μ L de aminoácidos no esenciales, cubiertas por aceite mineral y fueron cultivados durante 48 h. El día tres después de la FIV, los embriones fueron transferidos a gotas nuevas de 50 μ L de KSOM cubiertas por aceite mineral y fueron cultivados por 48 h. El día cinco después de la FIV, los embriones fueron transferidos a gotas nuevas de 50 μ L de KSOM suplementado con 5 μ L de SN a cada gota de cultivo; las gotas fueron cubiertas con aceite mineral y se incubaron durante 48 a 96 h.

El cultivo con medios utilizados para la PIV de embriones humanos se describe a continuación: los presuntos cigotos se lavaron una vez en HTF modificado y fueron colocados en grupos de 20 a 30 en gotas de 50 μ L de HTF modificado cubiertas con aceite mineral y cultivados por 48 h. El día tres después de la FIV, los embriones fueron transferidos a gotas de 50 μ L de IVC-Two suplementado con 10% de HSA, cubiertas con aceite mineral y cultivados por 48 h. El día cinco después de la FIV, los embriones fueron transferidos a gotas de 50 μ L de IVC-Three suplementado con 12% de HSA, cubiertas con aceite mineral y cultivadas por 48 a 96 h. Para ambos medios de cultivo, el día tres después de la FIV se determinó la tasa de división de los embriones y a los 7 a 9 días después de la FIV se evaluó el desarrollo embrionario a etapa de blastocisto usando un microscopio invertido (Olympus CKX31).

Análisis estadístico

Las diferencias en las tasas de división y tasas de blastocistos para los medios de cultivo utilizados se analizaron usando la prueba de Chi cuadrado y la exacta de Fisher, disponibles en el paquete estadístico SAS (Cody y Smith, 1991). Se consideró una probabilidad de $P < 0,05$ como estadísticamente significativa.

RESULTADOS

En el presente estudio, la tasa de maduración *in vitro* (porcentaje de ovocitos con *cumulus* expandido

del total de ovocitos puestos a madurar) para ovocitos bovinos fue 89,7% (1.308 ovocitos madurados/1.458 ovocitos colectados). La tasa de división (porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de cuatro o más células del total de ovocitos fertilizados *in vitro*) fue 82,3% para ovocitos cultivados en KSOM y 80,1% para ovocitos cultivados en medio HTF modificado ($P > 0,05$; Cuadro 1). La tasa de desarrollo de blastocistos (porcentaje de blastocistos obtenidos del total de ovocitos fertilizados *in vitro*) fue 31,6% para embriones cultivados en KSOM y 29,5% para embriones cultivados en HTF modificado / IVC-Two e IVC-Three ($P > 0,05$; Cuadro 1).

DISCUSIÓN

Los ovocitos bovinos inmaduros permanecen en profase meiótica I dentro de los folículos ováricos, pero cuando son removidos de éstos y cultivados *in vitro* bajo condiciones adecuadas, reanudan la meiosis espontáneamente y aproximadamente 90% de ellos alcanzan la etapa de metafase II (Watson *et al.*, 2000; Hashimoto *et al.*, 2002; Mucci *et al.*, 2006).

La completa maduración del ovocito implica no sólo la adquisición de competencia meiótica, sino también la maduración citoplasmática (Motlik y Fulka, 1986). La maduración del ovocito depende en gran parte de la presencia de las células del *cumulus* que lo rodean, las cuales llevan a cabo funciones nutritivas y reguladoras (Sutovsky *et al.*, 1993; Cetica *et al.*, 1999).

Algunos factores secretados por las células del *cumulus*, tales como glicosaminoglicanos y hormonas esteroideas, intervienen en la maduración citoplasmática (Dode y Graves, 2002). La expansión de las células del *cumulus* es necesaria para la fertilización y desarrollo embrionario temprano (Salustri *et al.*, 1996; Eppig, 2001).

La tasa de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos obtenida en el presente estudio usando medio HTF modificado fue comparable a las tasas reportadas por diversos autores usando Medio de Cultivo Tisular 199 (TCM-199), las cuales variaron de 68 a 75% (De los Reyes *et al.*, 1999), 82 a 90% (Iwata *et al.*, 2004), 86% (Liu *et al.*, 2008) y 71% (Li *et al.*, 2009). La elección del medio de cultivo para la PIV de embriones bovinos depende de su eficiencia en la producción de blastocistos y de la competencia para el desarrollo que éstos muestren (Kuran *et al.*, 2002). Estudios

Cuadro 1. Tasas de división y desarrollo de blastocistos de ovocitos bovinos madurados, fertilizados y cultivados *in vitro* usando diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	KSOM	HTF/IVC-Two/ IVC-Three
Ovocitos cultivados/ fertilizados <i>in vitro</i>	660/1.308	648/1.308
Tasa de división†, %	82,3a‡ (543/660)	80,1a (519/648)
Tasa de blastocistos§, %	31,6a (209/660)	29,5a (191/648)
Tasa de blastocistos¶, %	38,5a (209/543)	36,8a (191/519)

† Ovocitos divididos/ fertilizados.

‡ Letras iguales indican ausencia de diferencia estadística entre medias de una fila ($P > 0,05$).

§ Blastocistos/ovocitos fertilizados.

¶ Blastocistos/embriones divididos.

realizados por Barnett y Bavister (1996) y Krisher *et al.* (1999) demostraron que el medio de cultivo puede afectar el metabolismo de los embriones resultantes.

En el presente estudio, las tasas de división y de desarrollo de blastocistos fueron similares para el cultivo en KSOM y para el cultivo en HTF/IVC-Two/ IVC-Three. En este sentido, Fernández *et al.* (2007) reportaron una tasa de fertilización de 72%, tasas de división de 27 a 38%, una tasa de desarrollo de mórulas de 13% y de desarrollo de blastocistos de 2,6%, utilizando como medio de cultivo HTF. Por su parte, Krisher *et al.* (1999) obtuvieron tasa de división de 85% para ovocitos cultivados tanto en medio de cultivo para embriones de hámster 6 (HECM-6), como en medio SOF y tasa de 84% para ovocitos cultivados en medio G1/G2. Estos mismos autores obtuvieron tasa de desarrollo de blastocistos de 45% en HECM6, 38% en SOF y 30% en G1/G2, del total de ovocitos fertilizados.

Utilizando como medio de cultivo el SOF, Boni *et al.* (1999) obtuvieron una tasa de división de 78% y una tasa de desarrollo de blastocistos de 28%. Kuran *et al.* (2002) reportaron tasas de división de 62 a 76% y de formación de blastocistos de 30 a 36% del total de embriones divididos. Stojkovic *et al.* (2002) indicaron una tasa de desarrollo de blastocistos de 9 a 17%; Palomares Naveda *et al.* (2004) obtuvieron tasas de división de 25 a 45% y de desarrollo a blastocistos de 11 a 35%; Lonergan *et al.* (2003b) reportaron tasa de división embrionaria de 81,4% y

tasa de producción de blastocistos de 20,9%; Iwata *et al.* (2004) reportaron tasas de división de 60 a 76% y tasas de desarrollo de blastocistos de 24 a 47%; Dhali *et al.* (2009) obtuvieron una tasa de división de 71% y de desarrollo de blastocistos de 29% y Li *et al.* (2009) reportaron una tasa de división de 70% y de desarrollo de blastocistos de 26%. Por otro lado, utilizando como medio de cultivo el CR1aa (medio CR1 adicionado con aminoácidos esenciales y no esenciales), Urrego *et al.* (2008) obtuvieron una tasa de división de 73% y de desarrollo de mórulas y blastocistos de 20%.

Sin embargo, de acuerdo con McEvoy *et al.* (2000), el alcanzar la etapa de blastocisto no garantiza que el embrión resulte apto para desarrollarse, por lo que es esencial, que los embriones que alcancen la etapa de blastocisto sean de la mejor calidad posible para asegurar óptimos porcentajes de gestación después de su transferencia (Lonergan *et al.*, 2003b). Es sabido que la calidad de los blastocistos PIV es menor a la de aquéllos producidos *in vivo*, ya que en comparación con éstos, los embriones PIV muestran diferencias ultraestructurales (Crosier *et al.*, 2001; Fair *et al.*, 2001) que pueden resultar del sistema de cultivo específico usado (Thompson, 1997; Abe *et al.*, 1999). Los efectos detrimentales del cultivo *in vitro* bajo condiciones subóptimas están mediados por modificaciones en la expresión genética del embrión. Estos efectos pueden expresarse como blastocistos incapaces de soportar la criopreservación o de mantener una gestación, así como la producción de crías de talla anormal, como ha sido observado en rumiantes (Young *et al.*, 1998) y

que se ha asociado directamente con el cultivo *in vitro* post-fertilización (McEvoy *et al.*, 1998). Lonergan *et al.* (2003b) indicaron una sensibilidad temporal de los embriones bovinos al ambiente de cultivo post-fertilización, manifestada en términos de calidad de los blastocistos producidos, concluyendo que el período de cultivo después de la fertilización (desde el día 1 al día 7) fue el más crítico para determinar la calidad del blastocisto.

En el presente estudio se pudo determinar que los medios de cultivo utilizados para PIV de embriones humanos fueron igualmente eficientes en la producción de blastocistos bovinos, que uno de los medios comúnmente utilizados para este fin. Esto representa una alternativa para la PIV de embriones bovinos en los casos en que se dificulta conseguir los medios que esta técnica requiere, ya que si se puede tener acceso a medios utilizados en reproducción asistida en humanos, éstos podrían emplearse para la PIV de embriones bovinos obteniendo una respuesta similar a la que se conseguiría con los medios comúnmente usados para esta especie.

CONCLUSIONES

Las tasas de desarrollo *in vitro* de blastocistos bovinos fueron similares para los embriones cultivados en un medio convencional para PIV de embriones bovinos y para los embriones cultivados en medios utilizados para PIV de embriones humanos. Por lo tanto, éstos últimos podrían utilizarse como alternativa para la PIV de embriones bovinos.

LITERATURA CITADA

- Abe H., S. Yamashita, T. Itoh, T. Satoh y H. Hoshi. 1999. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or *in serum*-supplemented medium. *Mol. Reprod. Dev.*, 53(3): 325-335.
- Barnett D.K. y B.D. Bavister. 1996. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Mol. Reprod. Dev.*, 43(1): 105-133.
- Blondin P., D. Bousquet, H. Twagiramungu, F. Barnes y M.A. Sirard. 2002. Manipulation of follicular developmental to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 66: 38-43.
- Boni R., E. Tosti, S. Roviello y B. Dale. 1999. Intercellular communication in *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine embryos. *Biol. Reprod.*, 61: 1050-1055.
- Calado A.M., E. Rocha, A. Colaço y M. Sousa. 2001. Stereologic characterization of bovine (*Bos taurus*) cumulus-oocyte complexes aspirated from small antral follicles during the diestrous phase. *Biol. Reprod.*, 65: 1383-1391.
- Cetica P., G. Dalvit y M. Beconi. 1999. Study of evaluation criteria used for *in vitro* bovine oocyte selection and maturation. *Biocell*, 23(1): 125-133.
- Cody R.P. y J.K. Smith. 1991. *Applied Statistics and the SAS Programming Language*. Prentice Hall. Englewood Cliff, EUA.
- Crosier A.E., P.W. Farin, M.J. Dykstra, J.E. Alexander y C.E. Farin. 2001. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 64: 1375-1385.
- De los Reyes M., J.P. Aguayo, H. del Campo y C. Barros. 1999. Evaluación de ovocitos de vaca para maduración en cultivo. *Avan. Cien. Vet.*, 14(1-2): 42-53.
- Dhali A., V.M. Anchamparathy, S.P. Butler, R.E. Pearson y F.C. Gwazdauskas. 2009. *In vitro* development of bovine embryos cultured with stem cell factor or insulin-like growth factor-I following IVF with semen of two bulls having different field fertility. *Anim. Reprod. Sci.* (En prensa).
- Dode M.A. y C. Graves. 2002. Involvement of steroid hormones on *in vitro* maturation of pig oocytes. *Theriogenology*, 57(2): 811-821.
- Eppig J.J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122: 829-838.
- Fair T., P. Lonergan, A. Dinnyes, D. Cottell, P. Hyttel, F. A. Ward y M.P. Boland. 2001. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of embryo production on blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.*, 58(2): 186-195.
- Fernández A., T. Díaz y G. Muñoz. 2007. Producción *in vitro* de embriones bovinos. *Rev. Fac. Cien. Vet. UCV*. 48(1): 51-60.
- Galli C., G. Crotti, C. Notari, P. Turini, R. Duchi y G. Lazzari. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*,

- 55(6): 1341-1357.
- Galli C., R. Duchi, G. Crotti, N. Turini, N. Ponderato, S. Colleoni, I. Lagutina y G. Lazzari. 2003. Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, 59(2): 599-616.
- Gardner D.K., M. Lane, A. Spitzer y P.A. Batt. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol. Reprod.*, 50: 390-400.
- Hashimoto S., N. Minami, R. Takakura y H. Imai. 2002. Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 66: 1696-1701.
- Holm P., P.J. Booth, M.H. Schmidt, T. Greve y H. Callesen. 1999. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOF, a medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*, 52(4): 683-700.
- Holm P., P.J. Booth y H. Callesen. 2002. Kinetics of early *in vitro* development of bovine *in vivo*- and *in vitro*-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reproduction*, 123: 553-565.
- Iwata H., S. Hashimoto, M. Ohota, K. Kimura, K. Shibano y M. Miyake. 2004. Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction*, 127: 159-164.
- Krisher R.L., M. Lane y B.D. Bavister. 1999. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biol. Reprod.*, 60: 1345-1352.
- Kubisch H.M., M.A. Larson, A.D. Ealy, C.N. Murphy y R.M. Roberts. 2001. Genetic and environmental determinants of interferon-tau secretion by *in vivo*- and *in vitro*-derived bovine blastocysts. *Anim. Reprod. Sci.*, 66(1-2): 1-13.
- Kuran M., J.J. Robinson, D.S. Brown y T.G. McEvoy. 2002. Development, amino acid utilization and cell allocation in bovine embryos after *in vitro* production in contrasting culture systems. *Reproduction*, 124: 155-165.
- Li H.J., D.J. Liu, M. Cang, L.M. Wang, M.Z. Jin, Y.Z. Ma y B. Shorgan. 2009. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, 114(1-3): 89-98.
- Liu Z. y R.H. Foote. 1995. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty-five percent O₂. *Biol. Reprod.*, 53: 786-790.
- Liu Y., G.P. Li, L.F. Rickords, K.L. White, B.R. Sessions, K.I. Aston y T.D. Bunch. 2008. Effect of nicotine on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, 103(1-2): 13-24.
- Lonergan P., H. Khatir, F. Piumi, D. Rieger, P. Humblot y M.P. Boland. 1999. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex and pregnancy rates following transfer of bovine preimplantation embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 117: 159-167.
- Lonergan P., D. Rizos, A. Gutierrez Adan, T. Fair y M.P. Boland. 2003a. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod. Dom. Anim.*, 38: 259-267.
- Lonergan P., D. Rizos, J. Kanka, L. Nemcova, A.M. Mbaye, M. Kingston, M. Wade, P. Duffy y M.P. Boland. 2003b. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction*, 126: 337-346.
- Lonergan P., H.G. Pedersen, D. Rizos, T. Greve, P.D. Thomsen, T. Fair, A. Evans y M.P. Boland. 2004. Effect of the postfertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocysts. *Biol. Reprod.*, 71: 1096-1100.
- Marquant Le Guienne B., C. Guyader Joly, S. Ponchon, N. Delalleau, B. Florin, P. Ede, C. Ponsart, B. Guerin y P. Humblot. 2001. Results of *in vitro* production in a commercial ovum pick-up program. *Theriogenology*, 55(1): 433-440.
- McEvoy T.G., K.D. Sinclair, P.J. Broadbent, K.L. Goodhand y J.J. Robinson. 1998. Post-natal growth and development of Simmental calves derived from *in vivo* or *in vitro* embryos. *Reprod. Fertil. Dev.*, 10(6): 459-464.
- McEvoy T.G., K.D. Sinclair, L.E. Young, I. Wilmut y J.J. Robinson. 2000. Large offspring syndrome and other consequences of ruminant embryo

- culture *in vitro*: Relevance to blastocyst culture in human ART. *Human Fert.*, 3(4): 238-246.
- Memili E. y N.L. First. 2000. Zygotic and embryonic gene expression in cow: A review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote*, 8(1): 87-96.
- Motlik J. y J. Fulka. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*, 25(1): 87-96.
- Mucci N., J.F. Aller, G.G. Kaiser, F. Hozbor y R.H. Alberio. 2006. Producción *in vitro* de embriones bovinos: Suplementación de los medios de cultivo con suero. *Arch. Med. Vet.*, 38(2): 97-104.
- Palomares Naveda R., H. Hernández Fonseca, E. Soto Belloso, R. González Fernández, A. De Ondiz Sánchez, F. Perea Ganchou, S. Sirisathian y B. Brackett. 2004. Efecto del factor de crecimiento epidermal (EGF) durante la maduración de oocitos sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Rev. Cien. Fac. Cien. Vet. LUZ*, 14(2): 162-167.
- Rivera R.M., J.L. Edwards, A.D. Ealy, V.M. Monterroso, A.C. Majewski, C.M. Franco y P.J. Hansen. 2004. Procedures for *in vitro* production of bovine embryos. Dept. Animal Sciences, University of Florida. Gainesville, EUA.
- Rizos D., F. Ward, P. Duffy, M.P. Boland y P. Lonergan. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.*, 61(2): 234-248.
- Rosenkrans C.F. Jr. y N.L. First. 1994. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 72(2): 434-437.
- Salustri A., A. Camaioni y C. D'Alessandris. 1996. Endocrine and paracrine regulation of cumulus expansion. *Zygote*, 4(4): 313-315.
- Stojkovic M., S. Kölle, S. Peinl, P. Stojkovic, V. Zakhartchenko, J.G. Thompson, H. Wenigerkind, H.D. Reichenbach, F. Sinowatz y E. Wolf. 2002. Effects of high concentrations of hyaluronan in culture medium on development and survival rates of fresh and frozen-thawed bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction*, 124: 141-153.
- Sutovsky P., J. Fléchon, B. Fléchon, J. Motlik, N. Peynot, P. Chesné e Y. Heyman. 1993. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during *in vitro* culture of cattle oocyte cumulus complexes. *Biol. Reprod.*, 49: 1277-1287.
- Thompson J.G. 1997. Comparison between *in vivo*-derived and *in vitro*-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.*, 9(3): 341-354.
- Urrego R., A. Tarazona, M. Olivera Ángel y O. Camargo. 2008. Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Rev. Col. Cien. Pec.*, 21(3): 398-405.
- Watanabe Y.F., A. Dayan, F.V. Meirelles y M.R. Watanabe. 2001. Pre and post implantation development of IVP bovine embryos. *Theriogenology*, 55(1): 441-448.
- Watson A.J. 1992. The cell biology of blastocyst development. *Mol. Reprod. Dev.*, 33(4): 492-504.
- Watson A.J., P. De Sousa, A. Caveney, L.C. Barcroft, D. Natale, J. Urquhart y M.E. Westhusin. 2000. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biol. Reprod.*, 62: 355-364.
- Young L.E., K.D. Sinclair e I. Wilmut. 1998. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.*, 3(3): 155-163.