

FECUNDACIÓN *In vitro*: ALTERNATIVA PARA LA MEJORA GENÉTICA EN BOVINOS

Herradón, PG; Quintela, LA; Becerra, JJ; Ruibal, S y Fernandez, M.*

INTRODUCCIÓN

Las grandes expectativas creadas por los procedimientos de producción de embriones *in vivo* se han visto defraudadas con el tiempo. Ello es consecuencia de que su rendimiento no es tan elevado como se suponía en un principio, debido a que el número de embriones transferibles obtenido en cada lavado es bajo, estabilizado en torno a 4,8 la especie bovina; a la existencia de hembras que no responden a los tratamientos para inducir una ovulación múltiple; a la necesidad de respetar periodos de descanso entre dos recogidas consecutivas y a la obligatoriedad de que las donantes estén en perfectas condiciones ginecológicas, situación difícil de mantener en las hembras pluríparas.

Estas circunstancias han creado la necesidad de desarrollar un procedimiento alternativo para la producción de embriones. Este procedimiento se basa en la utilización de ovocitos inmaduros, recogidos directamente del ovario con independencia de la edad y de la situación fisiológica de la hembra. Esta técnica ofrece la posibilidad de convertir a la hembra en productora de gametos, equiparándola a los machos productores de semen para la inseminación artificial, lo que supondría numerosas ventajas en los programas de selección. Sin embargo, existen varias diferencias fisiológicas entre los machos y las hembras, que dificultan la consecución de este objetivo. Así, la población de ovocitos presente en el ovario es limitada y no se renueva, sino que disminuye progresivamente con la edad como consecuencia de la atresia. Además, los ovocitos no son liberados al exterior, siendo preciso extraerlos del oviducto o de la corteza ovárica. Por otra parte, la población de ovocitos es muy heterogénea en cuanto a su calidad y grado de madurez.

EFICIENCIAS Y DEFICIENCIAS DE LA TÉCNICA

Desde 1981, año en el que nació el primer ternero procedente de un embrión producido *In vitro* (Brackett *et al*, 1982) esta técnica ha experimentado en la

especie bovina una evolución considerable. Así, en la actualidad se está aplicando para el mejorar el potencial reproductivo de las vacas donantes dentro de los programas MOET y en algunas ocasiones sustituye a la utilización de la superovulación. Los datos estadísticos publicados por la IETS indican que durante el año 2003 se obtuvieron 330.000 embriones bovinos a nivel mundial mediante fecundación *in vitro*, de los que fueron transferidos 106.200, lo que representa el 14,2% del total de los embriones transferidos (Thibier, 2004).

La utilización de la fecundación *In vitro* para la producción de embriones bovinos ha permitido demostrar sus numerosas aplicaciones, entre las que podemos destacar:

- Aumentar el rendimiento de los programas de producción de embriones a partir de hembras de elevado valor genético, ya que este procedimiento permite obtener ovocitos en novillas de más de 6 meses de edad y en vacas durante el primer trimestre de gestación y a partir de las 2-3 semanas del posparto (Galli *et al*, 2001). Esta técnica no interfiere con los ciclos productivos o reproductivos de la hembra donante y, además, evita la necesidad de utilizar gonadotropinas.
- Permite producir embriones a muy bajo coste, lo que permite transferir embriones de razas cárnicas en vacas de aptitud láctea no destinadas a la cría o utilizarlos para tratar la infertilidad derivada de problemas de ovulación, fecundación o mortalidad embrionaria precoz
- Permite obtener descendientes de hembras de elevada calidad la genética que deban ser sacrificadas por padecer enfermedades, infertilidad, por su avanzada edad o durante los programas de erradicación de enfermedades infecciosas (tuberculosis, brucelosis, leucosis, BSE).
- Permite el aprovechamiento de animales con determinadas formas de infertilidad: machos con oligospermias severas, hembras con alteraciones estructurales o funcionales del tracto genital.

* Departamento de Patología Animal (Unidad de Reproducción y Obstetricia). Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. Lugo. España. pgarherr@lugo.usc.es

- Incrementa de la eficacia de los procedimientos de selección, mediante la aplicación de técnicas de diagnóstico preimplantacional para identificar variantes alélicas de algunos genes de interés productivo.
- Facilita la utilización de semen sexado.

Sin embargo, esta técnica es todavía poco eficiente, lo que dificulta su aplicación a gran escala:

1.- A pesar de los numerosos esfuerzos realizados para mejorar la eficiencia de esta técnica continua teniendo un bajo rendimiento, el porcentaje de ovocitos capaces de transformarse en embriones transferibles se encuentra estancado entre el 30 y 40%.

2.- Los embriones producidos *in vitro* son de menor calidad que los obtenidos *in vivo*, existiendo entre ellos numerosas diferencias:

- Morfológicas: embriones más oscuros y de menor densidad por su mayor contenido citoplásmico de lípidos (Massip *et al.*, 1995), con un menor número de blastómeros, sobre todo a nivel de la masa celular interna (Rizos *et al.*, 2002), una zona pelúcida más frágil (Duby *et al.* 1999) reducción del espacio perivitelino y mayor velocidad de desarrollo (Thompson *et al.*, 1998; Lonergan *et al.*, 1999).
- Cromosómicas: una elevada proporción de los embriones presentan mixoploidia: células normales y células poliploides (Slimane *et al.*, 2000; Viuff *et al.* 2002),
- Funcionales: alteraciones en la comunicación intercelular, con una expresión anormal de las proteínas que conforman las uniones gap (Boni *et al.*, 1999).
- Metabólicas: mayor contenido en lípidos, presentando mayor concentración de triglicéridos y menor de lípidos de otras clases (Khurana y Niemann, 2000).
- Alteraciones en la expresión génica (Niemann y Wrenzycki, 2000; Lazzari *et al.*, 2002; Rizos *et al.*, 2003).
- Mayor incidencia de apoptosis (Pomar *et al.* 2005).

Todo ello determina una reducción de su potencial de desarrollo pre- y postimplantacional, ocasionado bajos porcentajes de gestación (30 a 40%), y una escasa resistencia a la criopreservación, dificultando su conservación a largo plazo.

3.- Incremento de la mortalidad embrionaria, abortos, problemas gestacionales como el hidroalantoides y alargamiento de la gestación

4.- Nacimiento de terneros muy voluminosos, con anomalías estructurales y funcionales, conocido con el nombre de síndrome de exceso de volumen fetal, que disminuyen el vigor de los animales en el momento de su

nacimiento y provocan una mayor mortalidad peri natal. Algunos estudios indican que más del 30% de los terneros derivados de embriones producidos *in vitro* presentan un peso superior a los 50 Kg, independientemente de su raza (Kruip y den Daas 1997).

5.- Incremento del porcentaje de distocias por exceso de volumen fetal.

LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *In vitro*: PASADO Y PRESENTE.

La producción de embriones *In vitro* es un procedimiento que consta de varias etapas, cada una de las cuales puede afectar a los resultados finales del proceso. Estas etapas pueden resumirse en las siguientes: obtención de ovocitos, selección de los ovocitos, maduración *In vitro* (MIV), fecundación *In vitro* (FIV) y cultivo de los cigotos resultantes hasta blastocistos (CIV).

Obtención de los ovocitos.

La obtención de los ovocitos se realiza a través de dos procedimientos básicos:

- A partir de hembras sacrificadas en el matadero, mediante la obtención de sus ovarios y la aspiración de los folículos con un diámetro comprendido entre 3 y 6 mm.
- A partir de animales vivos utilizando la aspiración transvaginal ecoguiada (OPU). Esta técnica permite recoger ovocitos en las hembras de más de 6 meses de edad, durante los primeros 3 meses de gestación y a partir de las 2-3 semanas del postparto, por lo que no interfiere con los ciclos productivos o reproductivos de las hembras donantes. En el caso de hembras muy jóvenes (menos de 6 meses de edad) es necesario recurrir a la laparoscopia.

Selección de los ovocitos

La vaca es una especie mono-ovulatoria por lo que la mayor parte de los ovocitos obtenidos tras la aspiración folicular están destinados a degenerar. Ello hace necesario estimar la calidad de los ovocitos antes de utilizarlos para la maduración *In vitro*, ya que solamente una parte de los mismos tienen la capacidad de ser fecundados y soportar el desarrollo embrionario.

La selección de los ovocitos se realiza generalmente en base a tres criterios: el diámetro del ovocito, el aspecto de su citoplasma y las características del cúmulo que lo rodea. El diámetro de los ovocitos condiciona su capacidad para madurar (Sato *et al.*, 1990; Fair *et al.*, 1995), de tal forma que los ovocitos bovinos con un diámetro inferior a 110 μm se encuentran todavía en fase de crecimiento y no han adquirido aun la capacidad para madurar.

Los ovocitos rodeados por un cúmulo compacto formado por varias capas de células, presentan

mayores porcentajes de maduración, fecundación y de desarrollo hasta blastocistos, que los que carecen de cúmulo o los que están rodeados solamente por la corona radiata (Xu *et al.*, 1986; Lonergan *et al.*, 1994; Momozawa y Fukuda, 1995; Stojkovic *et al.*, 2001).

Diversos autores han tratado de establecer una relación entre el aspecto del citoplasma y la competencia del ovocito para madurar, ser fecundado y soportar el desarrollo posterior (Younis *et al.*, 1989; Momozawa y Fukuda, 1995; Nagano *et al.*, 1999). Así, se ha comprobado que los ovocitos que presentan un ooplama oscuro muestran una acumulación de lípidos y un buen potencial para el desarrollo, mientras que los que presentan un citoplasma pálido tienen una baja densidad de orgánulos y escaso potencial de desarrollo. Por otra parte, cuando el ooplama es negro, los ovocitos están envejecidos y tienen un potencial para soportar el desarrollo muy bajo (Nagano *et al.*, 2006)

MADURACIÓN *In vitro*

La maduración *In vitro* constituye una etapa decisiva en el rendimiento del proceso de producción de embriones *In vitro*. Sin embargo, se le ha prestado una escasa atención, ya que si revisamos la bibliografía existente podemos comprobar que en muchos laboratorios se continúa empleando el procedimiento descrito por Fukui y Ono (1989), consistente en cultivar durante 24 horas los ovocitos inmaduros en TCM-199, suplementado con un 10% de suero fetal, gonadotropinas (FSH y LH), y 17 β -estradiol, a una temperatura de de 38,5° C en una atmósfera con un 5% de CO₂ en aire. No obstante, existen claras evidencias de que los ovocitos madurados *In vivo* tienen una competencia para el desarrollo notablemente superior a los madurados *In vitro* (Dieleman *et al.*, 2002). Cuando las condiciones en las que se produce la maduración son muy desfavorables, se observa el bloqueo de la meiosis y de la fecundación. Sin embargo, cuando el sistema empleado tiene pequeñas imperfecciones sus efectos no se manifiestan hasta la segmentación o la formación de blastocistos y en muchos casos no se observan hasta después de la implantación. Se ha comprobado recientemente que el cultivo de los gametos y de los embriones en condiciones inapropiadas induce cambios epigenéticos en el genoma embrionario (Niemann y Wrenzycki, 2000) y en la expresión génica (Rinaudo y Schultz 2004).

En la actualidad estamos trabajando en tres direcciones: sustitución del TCM-199 por fluido oviductal sintético modificado (mSOF), incubación en una atmósfera gaseosa con bajo contenido en oxígeno y evitar la utilización de suplementos de composición indefinida.

El TCM-199 fue diseñado para satisfacer las necesidades de las células somáticas durante prolongados periodos

de cultivo. Sin embargo, no es el más apropiado para las necesidades complejas y dinámicas de los ovocitos en maduración. El SOF es el medio más utilizado en la actualidad para el cultivo *In vitro* de los embriones bovinos, por ello nos planteamos utilizarlo, también, durante la maduración y así evitar continuos cambios en la concentración de iones, sustratos energéticos, pH y osmolaridad. Nuestros resultados demostraron que utilización de SOF, suplementado con distintas sustancias, durante la maduración de los ovocitos bovinos en permitía obtener resultados comparables a los de TCM-199 (Ruibal *et al.*, 2006).

La maduración *In vitro*, generalmente, se realiza bajo una atmósfera con un contenido en oxígeno del 20%, situación que difiere notablemente de la existente en el interior del tracto genital. Así, los niveles de oxígeno en los folículos ováricos, el oviducto y el útero oscilan entre el 1,5 y el 8 % (Harvey, 2007). Algunos estudios recientes han analizado el efecto de la MIV en bajas tensiones de oxígeno, pero los resultados son contradictorios, observándose mejoras en el porcentaje de blastocistos (Karja *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2005), ausencia de diferencias (Iwamoto *et al.*, 2005) o efectos desfavorables (Oyamada y Fukui, 2004). Sin embargo, la formación de moléculas de oxígeno reactivo (ROS), sustancias que provocan multitud de efectos nocivos en las células, disminuye cuando se reduce la tensión de oxígeno. Por lo tanto, nos planteamos utilizar una atmósfera con bajo contenido en oxígeno durante la maduración, al objeto de reducir sus efectos negativos sobre el desarrollo, el metabolismo y la expresión génica de los embriones. Nuestros resultados demostraron que era posible madurar los ovocitos bovinos utilizando un medio libre de proteínas y una atmósfera con bajo contenido en oxígeno. Sin embargo, los resultados obtenidos estaban supeditados a la concentración de glucosa presente en el medio de cultivo, de tal forma que únicamente se consiguieron buenos resultados cuando el medio contenía 10 mM de glucosa. Estos resultados coinciden con los descritos previamente por Hashimoto *et al.* (2000). Nuestros resultados nos llevaron a plantearnos la posibilidad de que en estas condiciones atmosféricas la concentración de glucosa presente en el medio de maduración pudiera condicionar la evolución meiótica de los ovocitos. Para ello realizamos un nuevo experimento evaluando la progresión meiótica en presencia de diferentes concentraciones de glucosa. Nuestros resultados demostraron que bajo una atmósfera pobre en oxígeno, la concentración de glucosa resulta crítica para la maduración meiótica de los ovocitos bovinos. Así, cuando los complejos cúmulo ovocito fueron cultivados en mSOF bajo una atmósfera pobre en oxígeno, solamente los ovocitos madurados en un medio con 10 mM de glucosa alcanzaron al final del periodo de cultivo un porcentaje de metafase II comparable al obtenido en el grupo control.

Los medios utilizados durante la maduración *In vitro* de los ovocitos bovinos han sido suplementados con diversas sustancias proteicas, destacando el suero, la albúmina sérica bovina (BSA) y algunas hormonas. Se ha comprobado que el suero favorece la maduración de los ovocitos bovinos (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1986), pero su composición compleja, indefinida y variable transforma en indefinido cualquier medio de cultivo al que sea añadido, además, representa un riesgo de índole sanitaria. La sustitución de estas proteínas por macromoléculas sintéticas no metabolizables como la polivinil pirrolidona con un peso molecular de 40.000 (PVP-40) nos permite obtener resultados similares (Ruibal *et al.*, 2006) y al mismo tiempo disponer de un medio de maduración químicamente definido. Por otra parte, se han empleado durante mucho tiempo gonadotropinas hipofisarias o placentarias para favorecer la maduración de los ovocitos bovinos. No obstante, estas sustancias presentan grandes variaciones en su grado de pureza y contiene numerosos contaminantes, lo que ocasiona que los resultados obtenidos sean en muchas ocasiones contradictorios, muy variables y difíciles de comparar (Zuelke y Brackett, 1990; Choi *et al.*, 2001). En la actualidad podemos sustituirlas por FSH y LH de origen recombinante, cuya elevada pureza permitirá determinar con claridad sus acciones individuales, al tiempo que evita los efectos de la contaminación cruzada de los productos de origen hipofisario. Utilizando estas sustancias Anderiesz *et al.* (2000), observaron que la suplementación del medio de maduración con r-hFSH o con r-hLH no provocaba ningún efecto beneficioso. Sin embargo, cuando se combinaban ambas en una proporción 1:10, aumentaba la maduración meiótica y la competencia de los ovocitos para soportar desarrollo. Por el contrario Izadyar *et al.* (1998), observaron que la inclusión de r-hFSH en el medio de maduración incrementaba los porcentajes segmentación y de blastocistos, atribuyendo este último efecto a que favorece la maduración citoplasmática, dado que los porcentajes de ovocitos en metafase II no variaron. El 17 β -estradiol se incluye normalmente en los medios de maduración *In vitro* a razón de 1 μ g/ml, aunque se desconoce su importancia y se mecanismo de acción. Algunos estudios indican que favorece la segmentación cuando se añade un medio libre de suero, suplementado con FSH y LH; sin incrementar la cantidad de blastocistos obtenidos (Saeki *et al.*, 1991). No obstante, otros estudios recientes indican que los estrógenos afectan negativamente a la maduración nuclear de los ovocitos bovinos (Beker *et al.*, 2002), provocando una disminución de la proporción de ovocitos que alcanzan la metafase II y de blastocistos obtenidos, al tiempo que incrementan la frecuencia de anomalías nucleares. Sin embargo, la presencia de suero y FSH en el medio neutraliza el efecto negativo de los estrógenos (Beker *et al.*, 2002) lo que podría

explicar la dificultad para observar estos efectos adversos.

FECUNDACIÓN *In vitro*

Una vez que disponemos de ovocitos maduros, el siguiente objetivo es lograr la fecundación de los mismos, para ello se incuban junto a espermatozoides capacitados en un medio Tyrode, suplementado con fuentes energéticas (piruvato, lactato) y albúmina sérica (Yanagimachi, 1994). En la especie bovina, la capacitación espermática se ve favorecida por la incorporación de heparina al medio (Gordon, 1994). No obstante, para lograr unos resultados óptimos es necesario ajustar la concentración de heparina y el número de espermatozoides para cada eyaculado concreto (Lu y Seidel, 2004).

Recientemente se ha publicado un trabajo en el que se comprueba que la utilización de una baja tensión de oxígeno durante la fecundación *In vitro* de ovocitos ovinos, mejora la calidad de los blastocistos obtenidos (Leoni *et al.*, 2007).

CULTIVO *In vitro*

Los medios utilizados para el cultivo de los embriones bovinos han sido clasificados en tres categorías: indefinidos, cuando se utiliza suero y cocultivo con células somáticas; semidefinidos cuando se omite el cocultivo y el suero se reemplaza por albúmina sérica y definidos, cuando el suero se reemplaza por macromoléculas como el polivinil alcohol o la polivinil pirrolidona.

Los primeros intentos de cultivar embriones bovinos *in vitro* se toparon con la dificultad de que los embriones no superaban la etapa de 8 a 16 células, situación denominada "bloqueo del desarrollo" (Eystone y First, 1991), que no implicaba la muerte inmediata del embrión, pero que era irreversible. Para evitar este bloqueo se utilizó el cocultivo con células somáticas o los medios condicionados por dichas células (Fukui y Ono, 1988; Eystone y First, 1989; Nakao y Nakatsuji, 1990; Mermillod *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1995) y se suplementaron con suero (Sirard y First, 1988). Sin embargo, con el tiempo se demostró que la aplicación de estos procedimientos de cultivo generaba diversos inconvenientes. En primer lugar, esta metodología, que implicaba la utilización de medios indefinidos, dificulta notablemente el conocimiento de las necesidades de los embriones durante sus etapas de desarrollo temprano. Además, estas condiciones suponen un elevado riesgo de incorporar patógenos durante el cultivo. Por otra parte, diversos estudios han demostrado que la incorporación de suero al medio de cultivo es uno de los principales factores responsables de la presentación del síndrome de exceso de volumen fetal y de la baja resistencia a la criopreservación de los embriones obtenidos (Farin *et al.*, 2001).

Diversos autores trataron de determinar los mecanismos a través de los cuales el cocultivo con células somáticas produce sus efectos beneficiosos y fruto de estos trabajos se establecieron varias hipótesis: producción de compuestos con actividad mitogénica para las células embrionarias (Bavister *et al.*, 1992; Kane *et al.*, 1992; Mermillod *et al.*, 1992), producción de sustancias que favorecen la diferenciación celular (Kane *et al.*, 1992), eliminación o degradación de algunas sustancias embriotóxicas presentes en el medio de cultivo (Pinyopummintr y Bavister, 1991; Bavister *et al.*, 1992; Kane *et al.*, 1992; Mermillod *et al.*, 1992), modificación de las concentraciones de algunos substratos energéticos (Moore y Bondioli, 1993; Rieger *et al.*, 1995; Edwards *et al.*, 1997). No obstante, durante este mismo periodo se obtuvieron suficientes evidencias de que necesidad de utilizar un cocultivo con células somáticas era consecuencia de que las inapropiadas condiciones de cultivo utilizadas (composición del medio, atmósfera gaseosa, etc) (Bavister 1992). Así, se ha podido comprobar que cuando la composición del medio de cultivo es adecuada y la tensión de O₂ es reducida, es posible lograr elevados porcentajes de blastocistos en ausencia de células somáticas (Keskintepe *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995; Keskintepe y Brackett, 1996).

Una vez comprobada la posibilidad de eliminar el cocultivo con células somáticas, el siguiente reto fue el tratar de eliminar otros componentes causantes de la indefinición del medio, suero o albúmina sérica, sustituyéndolos por macromoléculas sintéticas. Los primeros estudios en los que se demostró la posibilidad de cultivar los cigotos bovinos hasta blastocistos en un medio completamente definido, obteniendo de un pequeño número de gestaciones, fueron publicados por Keskintepe *et al.* (1995) y Keskintepe y Brackett (1996).

Los medios simples más utilizados para el cultivo de los embriones bovinos son: el fluido oviductal sintético, cuya composición fue establecida por Tervit *et al.* (1972) en base a los componentes encontrados en el fluido oviductal ovino, y el KSOM (Liu y Foote, 1995). Estos medios han sido suplementados con numerosos componentes al objeto de satisfacer las necesidades nutricionales de los embriones. El componente "nuevo" que más ha contribuido a incrementar la eficacia de estos medios simples son los aminoácidos esenciales y no esenciales (Gardner *et al.*, 1994). Sin embargo, estos medios todavía necesitan ser mejorados sensiblemente, puesto que el cultivo de los embriones producidos *in vitro* en el interior del oviducto incrementa notablemente la calidad de los mismos

Algunos autores señalan que la utilización de un único medio durante todo el periodo de cultivo impide la

consecución de buenos resultados. Ello motivó el desarrollo de los denominados medios de cultivo secuenciales, que han sido diseñados para satisfacer las necesidades nutricionales de los embriones en sus distintas etapas de desarrollo (Lane *et al.* 2003; Nedambale *et al.*, 2006). No obstante, todavía es necesario continuar desarrollando estos medios de cultivo para incrementar su eficiencia durante el cultivo de los embriones bovinos.

REFERENCIAS

- Anderiesz C, Fong CY, Bongso A, Trounson AO. 2000. Regulation of human and mouse oocyte maturation *in vitro* with 6-dimethylaminopurine. *Hum Reprod.* 15: 379-88.
- Bavister BD, Rose-Hellekant TA y Pinyopummintr T. 1992. Development of *in vitro* matured/ *in vitro* fertilized bovine embryos into morula and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology* 37: 127-146.
- Bavister BD. 1981. Substitution of a synthetic polymer for protein in a mammalian gamete culture system. *J Exp Zool* 217: 45-51.
- Bavister BD. 1992. Co-culture for embryo development: is it really necessary? *Hum Reprod* 7: 1339- 1341.
- Beker ARCL, Colenbrander B, Bevers MM. 2002. Effect of 17β-estradiol on the *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Theriogenology* 58: 1663-1673.
- Boni R, Tosti E, Roviello S y Dale B. 1999. Intracellular communication in *in vivo*- and *in vitro* produced bovine embryos, *Biol. Reprod.* 61: 1050-1055.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel ML 1982 Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod* 27: 147-158.
- Choi YH, Carnevale EM, Seidel GE Jr, y Squire EL. 2001. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology* 56: 661-670.
- Dielman SJ, Hendriksen PJM, Viuff D, Thomsen PD, Hyttel P, Knijn HM, Wrenzycki C, Kruip TAM, Niemann H, Gadella BM, Bevers MM, Vos PLAM. 2002. Effect of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology* 57: 5-20.
- Duby RT, Hill JL, O'Callaghan D, Overstrom EW, Boland MP. 1997. Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts, *Theriogenology* 47: 332

- Edwards LJ, Batt PA, Gandolfi F y Gardner DK. 1997. Modifications made to culture medium by bovine oviduct epithelial cells: Changes to carbohydrates stimulate bovine embryo development. *Mol Reprod Dev* 46: 146-154.
- Eyestone WH y First NL. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fertil* 85: 715-720.
- Eyestone WH y First NL. 1991. Characterisation of developmental arrest in early bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology* 35: 612-624.
- Fair T, Hyttel P y Greve T 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol. Reprod. Dev.* 42: 437-42.
- Farin PW, Crosier AE, Farin CE. 2001. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology* 55: 151-70.
- Fukui Y y Ono H. 1989. Effects of sera, hormones, and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J Reprod Fertil.* 86: 501-506.
- Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N y Colleoni S. 2003. Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59: 599-616.
- Gardner, D.K., Lane, M., Spitzer, A., Batt, P., 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.
- Gordon I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. (Biotechnology in agriculture series). CAB International. Wallingford (United Kingdom).
- Harvey AJ. 2007. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Anim Reprod Sci* 98: 113-128.
- Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Yamada M, Imai H, Kashima N. 2000. Low oxygen tension during *in vitro* maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. *Mol. Reprod. Dev.* 57: 353-360.
- Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. 1999. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 52: 683-700.
- Iwamoto M, Onishi A, Fuchimoto D, Somfai T, Takeda K, Tagami T, Hanada H, Noguchi J, Kaneko H, Nagai T, Kikuchi K. 2005. Low oxygen tension during *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes improves parthenogenetic activation and subsequent development to the blastocyst stage. *Theriogenology* 63: 1277-1289.
- Izadyar F, Zeinstra E y Bevers MM. 1998. Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 51: 339-345.
- Kane MT, Carney EW, Ellington JE. 1992. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos *in vitro*. *Theriogenology* 38: 297-313.
- Karja NWK, Wongsrikeao P, Murakami M, Agung B, Fahrudin M, Nagai T, Otoi T. 2004. Effects of oxygen tension on the development and quality of porcine *in vitro* fertilized embryos. *Theriogenology* 62: 1585-1595.
- Keskintepe L y Brackett BG. 1996. *In vitro* developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol Reprod* 55: 333-339.
- Keskintepe L, Burnley CA, Brackett BG. 1995. Production of viable bovine blastocysts in defined *in vitro* conditions. *Biol Reprod* 52: 1410-1417.
- Khurana NK y Niemann H. 2000. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos, *Theriogenology* 54: 741-756.
- Kruij TAM y den Daas JHG. 1997. *In vitro* produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology* 47: 43-52.
- Lane M, Gardner DK, Hasler MJ, Hasler JF. 2003. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. *Theriogenology* 60: 407-419.
- Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Duchi R, Kruij T, Niemann H y Galli C. 2002. Cellular and Molecular Deviations in Bovine *In Vitro*-Produced Embryos Are Related to the Large Offspring Syndrome. *Biol Reprod.* 67: 767-775.
- Leibfried-Rutledge ML, Critser ES y First NL. 1986. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin

- on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocytes complexes. *Biol Reprod* 35: 850-857.
- Leoni GG , Rosati I , Succu S, Bogliolo L, Bebbere D, Berlinguer F, Ledda S y S Naitana. 2007. A Low Oxygen Atmosphere during IVF Accelerates the Kinetic of Formation of *in vitro* Produced Ovine Blastocysts. *Reprod Dom Anim* 42: 299-304
- Liu Z y Foote RH. 1995. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biol Reprod*. 53:786-790.
- Liu Z y Foote RH. 1997. Effects of amino acids and α -amanitin on bovine embryo development in a simple protein-free medium. *Mol Reprod Dev* 46: 278-285.
- Liu Z, Foote RH, Yang X. 1995. Development of early bovine embryos in co-culture with KSOM and taurine, superoxide dismutase or insulin. *Theriogenology* 44: 741-750.
- Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP y Gordon I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. *Mol Reprod Dev*. 37: 48-53.
- Lonergan P.y, O’Kearney-Flynn M.y y Boland M.yP. 1999. Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension, *Theriogenology* 51: 1565-1576.
- Lu KH y Seidel GE Jr. 2004 Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. *Theriogenology* 62: 819-830.
- Massip A, Mermillod P y Dinnyes A. 1995. Morphology and biochemistry of *in vitro* produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Human Reprod* 10: 3004-3011.
- Mermillod P, Mourmeaux JL, Wils C, Massip A y Dessy F. 1992. Protein-free oviduct-conditioned medium for complete bovine embryo development. *Vet Rec* 130: 13.
- Momozawa K y Fukuda Y. 1995. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes with heterogeneous ooplasm. *Anim. Sci. Tech*. 66: 605-609.
- Moore K y Bondioli KR. 1993. Glycine and alanine supplementation of culture medium enhances development of *in vitro* matured and fertilized cattle embryos. *Biol Reprod* 48: 833-840.
- Nagano M, Katagiri S y Takahashi Y. 2006. Relationship between bovine oocyte morphology and *in vitro* developmental potential. *Zygote* 14: 53-61.
- Nagano M, Takahashi Y y Katagiri S. 1999. *In vitro* fertilization and cortical granule distribution of bovine oocytes having heterogeneous ooplasm with dark clusters. *J. Vet. Med. Sci*. 61: 531-535.
- Nakao H y Nakatsuji N. 1990. Effects of co-culture, medium components and gas phase on *in vitro* culture of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. *Theriogenology* 33: 591-600
- Nedambale TL, Du F, Yang X, Tian XC. 2006. Higher survival rate of vitrified and thawed *in vitro* produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with betamercaptoethanol. *Anim Reprod Sci.*, 93:61-75.
- Niemann H y Wrenzycki C. 2000 Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology*. 53: 21-34.
- Oyamada T y Fukui Y. 2004 Oxygen tension and medium supplements for *in vitro* maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *J Reprod. Dev*. 50: 107-117.
- Park J, Hong JY, Yong HY, Hwang WS, Lim JM y Lee ES. 2005. High oxygen tension during *in vitro* oocyte maturation improves *in vitro* development of porcine oocytes after fertilization. *Anim. Reprod. Sci*. 87: 133-141.
- Pinyopummintr T y Bavister BD. 1991. *In vitro*-matured/*in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in a chemically defined, protein-free culture media. *Biol Reprod* 45: 736-742.
- Pomar FJ, Teerds KJ, Kidson A, Colenbrander B, Tharasanit T y Aguilar B. 2005. Differences in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocysts of farm animal species: a comparative study, *Theriogenology* 63: 2254-2268.
- Rieger D, Grisart B, Semple E, Van Langendonck A, Betteridge KJ y Dessy F. 1995. Comparison of the effects of oviductal cell co-culture and oviductal cell-conditioned medium on the development and metabolic activity of cattle embryos. *J Reprod Fertil* 105: 91-98.
- Rinaudo P y Schultz R. 2004 Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation

mouse embryos. *Reproduction*. 128: 301-311.

Rizos D, Fair T, Papadopoulos S, Boland MP, Lonergan P. 2002. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro *Mol Reprod Dev* 62: 320-327.

Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Pérez-Garnelo S, De la Fuente J, Boland MP, Lonergan P. 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod*, 68: 236-243.

Ruibal S, Quintela LA, Peña AI, Becerra JJ y Herradón PG. 2006. Defining bovine oocyte in vitro maturation. *Reprod Dom Anim* 41: 108.

Saeki K, Hoshi M, Liebfried-Rutledge ML y First NL. 1991. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol Reprod* 44: 256-260.

Sato E, Matsuo M y Miyamoto H 1990. Meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*: improvement of meiotic competence by dibutyl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate 1. *J. Anim. Sci.* 68: 1182-7.

Sirard MA y First NL. 1988. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol Reprod* 39: 229-234.

Slimane W, Heyman Y, Lavergne Y, Humblot P y Renard, J.P. 2000. Assessing chromosomal abnormalities in two-cell bovine in vitro-fertilized embryos by using fluorescent in situ hybridization with three different cloned probes. *Biol Reprod*, 62 : 628-635.

Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves PB y Wolf E 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biol. Reprod.* 64: 904-909.

Thibier M. 2004. Data Retrieval Committee Report. Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increase of *in vitro* bovine produced embryos in some parts of the world. *Embryo Transfert Newsletter* 22: 12-19.

Thompson JG, Allen NW, McGowan LT, Bell AC, Lambert MG y Tervit HR. 1998. Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development in vitro and following transfer. *Theriogenology* 49: 1239-1249.

Viuff D, Palsgaard A, Rickords L, Lawson LG, Greve T, Schmidt M, Avery B, Hyttel P y Thomsen, P.D. 2002. Bovine embryos contain a higher proportion of polyploid cells in the trophectoderm than in the embryonic disc. *Mol Reprod Dev*, 62: 483-488.

Xu KP, Greve T, Smith S y Hyttel P 1986. Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation *in vitro*. *Acta Vet. Scand.* 27: 505-19.

Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. En: *The Physiology of Reproduction*. Ed: Knobil E y Neill JD. Raven Press, New York, USA, Vol 1: 189-317.

Younis AI, Brackett BG y Fayrer-Hosken RA. (1989). Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Res.* 23: 189-201.

Zuelke KA y Brackett BG. 1990. Luteinizing hormones enhanced *in vitro* maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. *Biol Reprod.* 43: 784-787.