



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL.**

**EVALUACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO Y LA PRESENCIA DE LÍPIDOS
INTRACITOPLASMÁTICOS DURANTE LA MADURACIÓN Y DESARROLLO
IN VITRO DE EMBRIONES BOVINOS SUPLEMENTADOS
CON 3 FUENTES PROTEICAS DIFERENTES.**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA

ERIKA ALINA ORDÓÑEZ LEÓN.

**TUTOR: FESC-UNAM SALVADOR ROMO GARCÍA.
COMITÉ TUTORAL: FESC-UNAM ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ.
IIB-UNAM HORACIO MERCHANT LARIOS.**

MÉXICO, D.F. FEBRERO DE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS.

A Dios. Por haberme permitido llegar hasta este punto, por darme los medios y personas indicadas en el camino para poder cumplir con mis objetivos, pero sobre todo por cuidar y proteger a mi familia siempre.

A mis padres: Thelma y Luis Felipe por su interminable apoyo en todo momento de mi vida, por ser el faro que guía mi camino. Mamita gracias por no perder nunca la fe en mí, por enseñarme a creer que en mí misma, por todas aquellas noches que probablemente te deje sin sueño; sin tu apoyo y dedicación no podría haber llegado a este momento. Papá gracias por enseñarme a tener los pies en la tierra, porque siempre tengo presente tus palabras cuando te dije que iba a estudiar Veterinaria: Un Veterinario no es más que un campesino ilustrado... Y con certeza, aún me falta mucho por aprender. Gracias a los dos por enseñarme que con trabajo y esfuerzo no existen imposibles en la vida. Ahora más que nunca los quiero y entiendo más.

A mi esposo, colega y mejor amigo Julio, por emprender juntos esta loca aventura, llamada Familia, por tu amor, apoyo incondicional, consejos y tantas cosas más que no terminaría de escribir... Love youuu

A Julito, my prince... por cambiar la perspectiva de mi vida, por ser el mejor compañero de aventuras que Dios me pudo dar... Gracias por detenerme en mi alocada carrera, por enseñarme a amar limpia y profundamente; Te amo.

A mis hermanas Patty y Sonia. Porque con su ejemplo y sus infinitos consejos siempre me han impulsado a seguir adelante. Sin duda el amor de una hermana no tiene sustituto. Las quiero sistercitas.

A mis sobrinos Nicole, Pato y Toño: he aprendido tanto de ustedes, que siempre estaré en deuda. Gracias por el inmenso amor que recibo día a día de su parte. Por que cuando estamos juntos vuelvo a ser niña. Los amo.

Al Director General de Brasuca: Ing. Manuel Antonio Suárez Romero, pero que también considero parte de mi familia gracias por haber confiado en mí desde el inicio y brindarme la oportunidad de crecer en mi formación profesional y personal. Por ser un ejemplo de tenacidad, honestidad, dedicación y entrega al trabajo.

A mis más grandes Ángeles en el cielo... se que ustedes tienen mucho que ver con esto. Las quiero Lupita y Carmita.

A la familia Aysa de Salazar y Sabates Aysa a quienes considero también mi familia.

A todas aquellas personas que directa o indirectamente han contribuido a mi formación personal y profesional.

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme nuevamente la oportunidad de crecer profesionalmente.

Al CONACYT por otorgarme la beca con número de registro 45193.

A la empresa Brasuca por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo.

A mi tutor Dr. Salvador Romo García, por su tiempo, dedicación y enseñanza.

Al Dr. Alfredo Medrano Hernández por su invaluable apoyo, consejos y continúa enseñanza, sin su ánimo y colaboración en los momentos difíciles, nunca hubiera acabado

Al Dr. Horacio Merchant Larios, por su ayuda invaluable para la realización de este trabajo, por sus consejos para mi formación profesional.

A los miembros del Jurado: Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza, Dr. Mario Moreno Martínez, Dra. Yvonne Ducolomb, Dr. José Fernando de la Torre Sánchez por compartir sus conocimientos y tiempo de manera desinteresada.

Al MsC Francisco R. González Díaz por su invaluable apoyo para la realización de este trabajo, por sus consejos y apoyo moral.

M. en C. José Alejandro Marmolejo Valencia. Técnico Académico Titular "A" de T. C. Lab. del Dr. Horacio Merchant Larios Dpto. Biología Celular y Fisiología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Al MsC Moisés Peña Verduzco, por la ayuda y consejos recibidos para la realización de este trabajo

Al Dr. Gerardo Cansino Arroyo por su invaluable ayuda y su invaluable contribución para la realización de este trabajo.

Al Dr. José de Lucas Tron por su tiempo, ayuda y consejos siempre que lo necesite.

A mi amiga la futura Dra Alma Lilia Álvarez, por tu apoyo e invaluable amistad, por darme ánimos y no dejarme caer, sabes que cuentas conmigo siempre.

A mis amigos y compañeros de BRASUCA: Anaid Amador Lastra, José Luis Gerónimo Jiménez, Guadalupe Mendoza Fuentes por brindarme su apoyo, amistad y ánimos siempre que los necesite.

RESUMEN. El objetivo de este trabajo fue evaluar el desarrollo embrionario y el contenido de gotas lipídicas intracitoplasmáticas en embriones bovinos, comparando el efecto del medio suplementado con 3 fuentes proteicas diferentes: Suero Fetal Bovino (SFB) Suero de vaca en estro (SVE) y Serum Replacement® (SR) durante la maduración y desarrollo embrionario *in vitro*, en tres grupos raciales: *Bos indicus* (*Bi*), *Bos taurus* (*Bt*) y *Bos indicus* x *Bos taurus* (*Bi* x *Bt*). Se utilizaron 3921 ovocitos aspirados de folículos ováricos de vacas sacrificadas en el Frigorífico y Empacadora de Tabasco en los siguientes tratamientos: 1) Substituto Sintético de Suero o Serum Replacement (SR; n=1324), 2) Suero Fetal Bovino (SFB; n=1294), 3) Suero de Vaca en Estro (SVE; n=1303); estos suplementos se adicionaron a los medios TCM-199, TALP y SOF, durante la maduración, fertilización y desarrollo *in vitro*, respectivamente. El mayor porcentaje de embriones correspondió a los producidos con SFB y SVE, comparados con SR ($p < 0.05$). El mayor porcentaje de mórulas así como el menor de blastocistos expandidos se obtuvo de los ovocitos con SR ($p < 0.05$). Los ovocitos cultivados en SFB presentaron un mayor número de gotas lipídicas que los cultivados en SR y SVE ($p < 0.05$). Se observó menor acumulación de lípidos en aquellos embriones suplementados con SR. El menor número de gotas lipídicas en ovocitos correspondió al genotipo *Bi*, el mayor al *Bt*. La menor cantidad de gotas lipídicas en embriones se observó en *Bi* ($p < 0.05$). Se concluye que es posible producir embriones bovinos *in vitro* suplementando el medio SOF con un sustituto sintético de suero, aunque obteniendo menor porcentaje de blastocistos y un desarrollo embrionario más lento que lo que se obtiene con SFB y SVE. La ventaja es que con el suplemento de SR se disminuye la acumulación de gotas lipídicas en los embriones cultivados *in vitro*, por lo que dichos embriones presuntivamente pueden ser más resistentes a la criopreservación.

Palabras clave: Gotas lipídicas, suplementos proteicos, producción *in vitro*, embriones bovinos.

ABSTRACT.

The objective was to evaluate embryo development and the contents of intracytoplasmatic lipids in bovine embryos, comparing the effect of supplementing the media with 3 protein sources during *in vitro* maturation, fertilization and embryo development, in three breed types: *Bos indicus* (*Bi*), *Bos taurus* (*Bt*) and *Bos indicus* x *Bos taurus* (*Bi* x *Bt*). A total of 3921 oocytes aspirated from post-mortem cow's ovarian follicles were allocated in the following treatments: 1) Synthetic Serum Substitute or Serum Replacement (SR n=1324), 2) Fetal Calf Serum (FCS n=1294), 3) Estrus Cow Serum (ECS n=1303); these supplements were added to TCM-199, TALP and SOF media during *in vitro* Maturation, Fertilization and Development, respectively. A higher percentage of embryos was obtained in SFB and SVE treatments, than in SR ($p < 0.05$). The higher percentage of morulae and the lower percent of expanded blastocysts were obtained from oocytes with SR ($p < 0.05$). The oocytes cultured in SFB showed a higher number of lipid droplets than those cultured in SR and SVE ($p < 0.05$). A lower lipid accumulation was observed in those embryos supplemented with SR. The lowest number of lipid droplets in oocytes was for the *Bi* genotype and the highest for *Bt*. The least number of lipid droplets in embryos was observed in *Bi* ($p < 0.05$). It is concluded that it is possible to produce bovine embryos *in vitro*, supplementing SOF medium with a synthetic serum substitute, although obtaining lower blastocysts percentage and slower development than with FCS and ECS supplements. The advantage obtained with SR supplement is lesser accumulation of lipid droplets which could represent better resistance of the *in vitro*-produced embryos to cryopreservation.

Key words. Lipid droplets, protein supplements, *in vitro* production, bovine embryos.

INDICE

Lista de Cuadros.....	10
Lista de Figuras.....	11
I. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1.Antecedentes.....	13
1.2.Justificación.....	17
II.HIPÓTESIS.....	18
III.OBJETIVO GENERAL.....	18
3.1.Objetivos Especificos.....	18
IV.REVISIÓN DE LITERATURA.....	19
4.1. Ovogénesis y Foliculogénesis.....	19
4.1.1. Interacciones del ovocito con las Celulas Foliculares.....	22
4.1.2. Crecimiento Folicular.....	23
4.1.3. Fluido Folicular.....	27
4.1.4. Maduración nuclear y citoplasmática del ovocito.....	29
4.1.5. Factores que intervienen en la competencia de los ovocitos.....	31
4.2. Fertilización.....	34
4.3. Producción de embriones mediante fertilización <i>in vitro</i>	35
4.4. Obtención de ovocitos.....	42
4.4.1. Selección de los ovocitos.....	43
4.5. Maduración <i>in vitro</i>	44
4.6. Fertilización <i>in vitro</i>	45
4.6.1. Preparación del semen para la fecundación <i>in vitro</i>	46
4.7. Desarrollo de embriones <i>in vitro</i>	46
4.7.1. Criterios de evaluación de la Calidad del embrión bovino producido <i>in vitro</i>	47
4.8. Suplementación proteica para MIV y CIV.....	47
4.8.1. Requerimientos del embrión durante el cultivo <i>in vitro</i>	48
4.8.2. Acumulación de lípidos y su relación son el Suero Fetal Bovino.....	49
4.9. Diferencias de Ovocitos y embriones entre razas.....	51
4.10. Determinación del Contenido lipídico en ovocitos y embriones.....	52
V. MATERIAL Y METODOS.....	53
5.1. Selección de Donadoras.....	53

5.1.1. Obtención de Ovarios.....	54
5.1.2. Colección de Ovocitos.....	54
5.1.3. Maduración de los ovocitos.....	55
5.1.4. Fertilización <i>in vitro</i>	56
5.2. Desarrollo <i>in vitro</i>	57
5.2.1. Criterios para la evaluación de embriones.....	58
5.2.2. Evaluación morfológica de los embriones.....	58
5.2.3. Evaluación embrionaria.....	59
5.3. Análisis Morfológico.....	59
5.3.1. Microscopía Electrónica.....	60
5.3.2. Análisis de imágenes.....	60
5.4. Análisis Estadístico.....	61
VI. RESULTADOS.....	62
6.1. Ovocitos madurados y fertilizados.....	62
6.1.2. Embriones producidos con tres diferentes suplementos proteicos.....	62
6.1.3. Porcentaje de Embriones producidos con tres diferentes suplementos protéicos.....	62
6.2. Evaluación de los ovocitos madurados <i>in vitro</i> por microscopía electrónica de transmisión.....	64
6.2.1. Cuantificación de lípidos.....	67
VII. DISCUSIÓN.....	70
VIII. CONCLUSIONES.....	74
IX. PERSPECTIVAS.....	75
X. REFERENCIAS.....	76
Apéndice 1.....	115

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Características Fenotípicas en ganado bovino de dos grupos raciales.....	52
Cuadro 2. Ovocitos madurados y fertilizados <i>in vitro</i> y embriones divididos después de la adición de tres tipos de suplementos proteicos.....	61
Cuadro 3. Embriones bovinos producidos en medio Fluido Sintético de Oviducto adicionado con tres suplementos proteicos.....	61
Cuadro 4. Ovocitos de tres tipos raciales bovinos madurados y fertilizados <i>in vitro</i> , y la resultante división embrionaria <i>in vitro</i>	62
Cuadro 5. Embriones de tres tipos raciales de bovino cultivados en Fluido Sintético de Oviducto durante 7 días.....	63
Cuadro 6. Gotas de lípidos en ovocitos y embriones de bovino madurados <i>in vitro</i> en tres diferentes suplementos proteicos.....	66
Cuadro 7. Gotas de lípidos en las estructuras biológicas de tres grupos raciales de ovocitos bovinos madurados <i>in vitro</i>	68

Lista de Figuras

Figura 1. Microfotografías de luz y electrónicas de un ovocito de <i>Bos taurus</i> madurado en medio con Serum Replacement (SR).....	64
Figura 2 Ovocito de <i>Bos indicus</i> incubado en medio complementado con suero de vaca en estro (SVE).....	65
Figura 3. Cortes semifinos teñidos con azul de toluidina de blastocistos de bovino diferenciados, con diferentes complementos proteicos.....	65
Figura 4. Número de gotas lipídicas intracitoplasmáticas en ovocitos y embriones de bovino de tres tipos raciales cultivados con tres suplementos proteicos.....	67
Figura 5. Cantidad de lípidos totales en ovocitos <i>Bos indicus</i> madurados <i>in vitro</i>	68

I. INTRODUCCIÓN.

La Fertilización *in vitro* (FIV) se utiliza en bovinos para generar grandes cantidades de embriones para la transferencia embrionaria y para la producción de becerros (Romo, 2000), ya que permite multiplicar la cantidad de crías que pueden obtenerse de animales genéticamente superiores. Esta biotecnología implica las etapas de maduración y fertilización de ovocitos, así como el cultivo *in vitro* (CIV) de cigotos y embriones. Desde el inicio de la aplicación de la tecnología de producción de embriones *in vitro*, se han desarrollado numerosos sistemas de cultivo capaces de llevar a buen término la producción de embriones bovinos, llegándose a alcanzar porcentajes de producción de blastocistos cercanos al 40%, con respecto al número inicial de ovocitos madurados (Gordon, 1994). Los sistemas de cultivo han mejorado en términos de fisiología, ultraestructura y la morfología del embrión (Gardner 2008); sin embargo, la calidad de los embriones producidos *in vitro* es inferior a la de aquellos producidos *in vivo* (Abe *et al.*, 2002). Se ha observado que la adición de suero a los medios de cultivo inhibe los primeros estadios pero estimula el desarrollo de mórulas y blastocistos (Pinyopummintr y Bavister 1994, Thompson *et al.* 1998) y que tanto éstas como los blastocistos adquieren características similares a las de los obtenidos *in vivo* cuando son producidos en medios sin suero (Thompson 1998, Crosier *et al.*, 2000). El empleo de medios de cultivo libres de suero podría ser benéfico para mejorar la calidad de los embriones producidos *in vitro* ya se progresaría en el entendimiento de los requerimientos embrionarios durante los estadios de preimplantación, debido a que la eliminación de un compuesto altamente variable e indefinido, como es el suero, ayudaría a comprender la función de los diferentes medios de cultivo (Thompson, 2000 y Orsi y Leese 2004). Debido a que el ganado de razas Cebú (*Bos indicus*) constituye el 60% del ganado productor de carne a nivel mundial, particularmente en áreas tropicales del mundo, debido a su tolerancia al estrés térmico y la resistencia a los parásitos en comparación con razas europeas (*Bos Taurus*). El estrés calóricos es un problema de gran importancia ya que causa importantes pérdidas económicas en aproximadamente el 60% de los hatos en todo el mundo, en comparación con las razas europeas, el ganado Cebú tiene una reducción menor al consumo de alimento (Paula-Lopez *et al.*, 2013). Sin embargo los embriones de razas Cebuínas tienen mayor sensibilidad a los procedimientos de

criopreservación que los embriones de origen Europeo, esta sensibilidad se relaciona con los lípidos presentes en el citoplasma (De la Torre Sanchez et al., 2006) Los embriones de hembras Cebú, así como aquellos producidos *in vitro* son más susceptibles a los daños ocasionados por la criopreservación que los embriones de ganado *Bos taurus*, hecho que se ha relacionado con la mayor cantidad de lípidos que se encuentran en estos embriones (Varago et al., 2006), por lo que no sobreviven bien a los procedimientos utilizados para criopreservarlos. El reto actual de los investigadores en el área de producción de embriones *in vitro*, es desarrollar un sistema de cultivo que consiga complementar todas las necesidades de los embriones en desarrollo, minimizando el estrés celular y reduciendo la pérdida de viabilidad (Moore et al., 2007).

1.1 Antecedentes.

Desde el inicio de la aplicación de la tecnología *in vitro*, se han desarrollado numerosos sistemas de cultivo capaces de llevar a buen término la producción de embriones bovinos, llegándose a alcanzar porcentajes de producción de blastocistos cercanos al 40%, respecto al número inicial de ovocitos madurados (Gordon, 1990).

Un estudio comparado del desarrollo embrionario *in vitro* de óvulos madurados y fecundados *in vivo*, comparado con el desarrollo de embriones producidos completamente *in vitro*, evidenció diferencias morfológicas; los embriones fecundados *in vivo* tienen, en la fase de una célula, un espacio perivitelino mayor que los embriones *in vitro*; en el estadio de 8 células los blastómeros son de forma y tamaño regulares; las mórulas se compactan de forma sincrónica y las células de la Masa Celular Interna (MCI) de los blastocistos están bien definidas (Crosier et al., 2000). En el caso de los embriones producidos *in vitro* el espacio perivitelino en fase de una célula es muy limitado; en estadio de 8 células los blastómeros son irregulares en su forma y tamaño; la compactación de las mórulas es mucho menos pronunciada (en ocasiones no es apreciable), y las células de los blastocistos aparecen oscuras y difuminadas (Holm y Callesen, 1998). Por otra parte, la técnica de microscopía electrónica ha permitido identificar diferencias entre los embriones producidos *in vivo* e *in vitro*, en el mismo estadio de desarrollo, y en embriones producidos *in vitro* en función del medio de cultivo. Con esta técnica se ha observado que los blastómeros de los embriones producidos *in vitro* tienen un número mayor de vacuolas citoplasmáticas y fagosomas. Las uniones de comunicación o hendidura (uniones GAP) entre células son más cortas y menos numerosas (Greve et al., 1993). De manera general, los embriones cultivados *in vitro* tienen un aspecto más oscuro y el citoplasma

contiene una gran cantidad de inclusiones lipídicas, cuyo número varía en función de las condiciones de cultivo. Éstas son muy numerosas cuando se suplementa el medio con suero fetal, y son menos abundantes en el citoplasma de embriones cultivados en medios suplementados únicamente con albúmina sérica bovina BSA y aminoácidos (Dorland *et al.*, 1995; Thompson, 1997). Diversos estudios han demostrado que los embriones producidos *in vitro* son menos criotolerantes que los producidos *in vivo*. Una de las razones de esta sensibilidad ha sido atribuida a la cantidad de lípidos presentes dentro del citoplasma. Se ha demostrado que dichas inclusiones lipídicas son diferentes según el estadio del embrión siendo más abundantes en los estadios tempranos y disminuyendo en cuanto se forma el blastocisto (Pryor *et al.*, 2011). El suero fetal es considerado en general como una fuente de compuestos nitrogenados para los embriones preimplantados (Keskinetepe y Brackett, 1996); sin embargo, éste contiene un amplio grupo de moléculas definidas y no definidas que ejercen diversos efectos sobre el desarrollo *in vitro* de los embriones. Dentro de éstas moléculas están: nutrientes, hormonas, agentes quelantes de metales pesados y factores de crecimiento (Gardner y Lane, 1998). Dichos efectos han sido caracterizados desde benéficos para la competencia del desarrollo de ovocitos y embriones por los aportes de las moléculas mencionadas, hasta negativos para el desarrollo *in vitro*. Su empleo también se ha visto relacionado con una aceleración del desarrollo embrionario (Gómez y Diez 2000; Holm *et al.*, 2002), asociado a un número mayor de células embrionarias (Fouladi-Nashta *et al.*, 2005) y a una mejora en la tasa de producción y eclosión de blastocistos (Wang *et al.*, 1997; Gómez y Diez 2000). De tal forma que el suero fetal es considerado un compuesto de efectos variables y de composición esencialmente indefinida (Gardner y Lane 1998), lo que genera variaciones en la composición de los medios utilizados e interfiere con la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

Algunos efectos negativos que han sido atribuidos al uso de suero en los medios de cultivo son: excesiva producción de lactato, presencia de células oscuras y granuladas en la MCI (Bavister *et al.*, 1992; Krisher *et al.*, 1999), aumento de células apoptóticas (Byrne *et al.*, 1999), menor síntesis proteica (Kuran *et al.*, 2001), disminución tanto de la relación células de la MCI y células del trofoctodermo, como del número de complejos de unión entre las células embrionarias (Shamsuddin y Rodríguez-Martínez, 1994) y la acumulación anormal de gotas lipídicas intracitoplasmáticas (Abe *et al.*, 1999ab; Dorland *et al.*, 1994; Shamsuddin y Rodríguez-Martínez 1994; Thompson *et al.*, 1995). Se ha

demostrado que la acumulación de lípidos intracitoplasmáticos comienza a disminuir a partir del estadio de mórula, coincidiendo con la aparición de mitocondrias maduras pudiendo cumplir de este modo la función de reserva para momentos de gran demanda energética, como lo es la formación del blastocele (Abe *et al.*, 1999b). Por el contrario, en presencia de suero en los medios de cultivo la acumulación lipídica aumenta a partir del mencionado estadio (Ferguson y Leese 1999). Estos resultados plantean una interrogante acerca de cuál es el papel de las gotas lipídicas en el citoplasma de las células embrionarias, ya que su eliminación no produce una disminución en el porcentaje de producción de embriones, sino al contrario, mejora su calidad en términos de crioresistencia.

Diversos autores (Yamashita *et al.*, 1999, Cho *et al.*, 2001, Abe *et al.*, 2002, Cho *et al.*, 2002) obtuvieron mejores porcentajes de sobrevivencia post-criopreservación en embriones producidos en medios suplementados con BSA y libres de suero fetal, independientemente del sistema de criopreservación empleado.

Si bien no está totalmente claro cuál es el papel intracelular por el que actuarían la albúmina y el suero, algunas de sus propiedades físicas podrían ser reemplazadas mediante la utilización de sustancias definidas. El uso de polímeros sintéticos, como el alcohol polivinílico y la polivinilpirrolidona, es frecuente desde hace varios años en la producción *in vitro* de embriones (Ectors *et al.*, 1992, Gardner y Lane 1998). Estos compuestos han demostrado proveer una buena actividad surfactante, similar a la albúmina, aunque se ha encontrado una menor tasa de producción de embriones y diferencias metabólicas importantes entre embriones cultivados con o sin estos componentes (Thompson 2000, Orsi y Leese 2004). Sin embargo, otros autores observaron que, tanto la tasa de producción (Rorie *et al.*, 1994) como el número de células embrionarias (Thompson *et al.*, 1998, Gómez y Diez 2000, Sung *et al.*, 2004) no fueron afectados por la presencia o ausencia de suero. Contrariamente, Byrne *et al.*, (1999) y Ferguson y Leese (1999) encontraron una disminución en esta última variable cuando adicionaron suero en los medios de cultivo.

Actualmente existen en el mercado compuestos formulados con el fin de reemplazar el suero en los medios de cultivo de distintas líneas de células somáticas. Entre estos se encuentran el Ultrosor G[®] (Invitrogen), un sustituto del SFB, y del CPSR-3[®] (Controlled Process Serum Replacement, SIGMA), el cual se obtiene por dializado del plasma bovino. Duque *et al.*, (2003a) demostraron que es posible producir embriones *in*

vitro utilizando estos compuestos y observaron que el reemplazo del suero por Ultroser G[®] disminuyó significativamente la producción *in vitro* de embriones bovinos, mientras que utilizando CPSR-3[®] no obtuvieron diferencias en esta variable como tampoco en el número total de células embrionarias.

1.2 Justificación.

Durante muchos años se ha trabajado buscando reproducir artificialmente los eventos de la maduración y fertilización de ovocitos y el desarrollo embrionario temprano. Así, lo que en principio sólo tenía fines de investigación, en los últimos años se ha comenzado a utilizar con propósitos comerciales. Los resultados de producción *in vitro* de embriones en distintas especies fueron mejorando significativamente a medida que avanzaron los conocimientos acerca de sus requerimientos. Para ello, fue necesario transformar los medios de cultivo complejos y suplementados frecuentemente con suero, en medios más definidos, en los cuales cada uno de sus componentes pudiera ser estudiado en función del efecto que genera sobre el desarrollo embrionario, su sobrevivencia poscriopreservación, la tasa de gestación y el porcentaje de crías viables.

El empleo de medios de cultivo libres de suero podría ser benéfico para mejorar la calidad de los embriones producidos *in vitro*, ya que la eliminación de un compuesto altamente variable e indefinido, como lo es el suero fetal, posibilitaría comprender la función que desempeñan algunos de los componentes incluidos en los medios de cultivo. Esto permitiría progresar en el entendimiento de los requerimientos embrionarios durante los estadios de preimplantación. Además, permitiría evitar las alteraciones embrionarias (morfológicas) durante la gestación, atribuidas a la utilización de suero en los medios de cultivo. Por último, una mejora en la calidad de los embriones producidos *in vitro* permitiría obtener mejores porcentajes de gestación, producidas principalmente por la transferencia de embriones criopreservados, posibilitando la aplicación comercial en gran escala de esta biotecnología. Por lo que se justifica la necesidad de desarrollar un sistema simple de cultivo que confiera al ovocito la capacidad de maduración y que permita una buena tasa de fertilización y desarrollo embrionario.

II. HIPÓTESIS.

Al usar un suplemento sintético de suero, en comparación con el Suero Fetal Bovino y el Suero de Vaca en Estro, los ovocitos y embriones de vacas de razas *Bos indicus*, *Bos taurus* y *Bos indicus x Bos taurus* producirán mayores tasas de fertilización y desarrollo embrionario así como se disminuirá de manera importante la cantidad de gotas lipídicas intracitoplasmáticas.

III. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar en tres genotipos bovinos (*Bos indicus*, *Bos taurus* y *Bos indicus x Bos taurus*), el efecto de la suplementación con 3 diferentes fuentes proteicas: Suero Fetal Bovino (SFB), Suero de Vaca en Estro (SVE) y un sustituto comercial de suero denominado "Serum Replacement" (SR)®, durante la maduración y desarrollo embrionario *in vitro*, sobre la producción embrionaria así como sobre la acumulación de gotas lipídicas intracitoplasmáticas.

3.1 Objetivos específicos.

1. Determinar la cantidad de gotas lipídicas intracitoplasmáticas en ovocitos de los 3 tipos raciales: *Bos indicus*, *Bos taurus* y *Bos taurus x Bos indicus*.
2. Determinar la cantidad de gotas lipídicas intracitoplasmáticas en embriones de 3 grupos raciales: (*Bos indicus*, *Bos taurus* y *Bos taurus x Bos indicus*)
3. Determinar el porcentaje de desarrollo embrionario en los diferentes grupos raciales y suplementos proteicos
3. Determinar el tipo de suero que produzca la menor cantidad de gotas lipídicas intracitoplasmáticas.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Ovogénesis y Folliculogénesis

En las hembras de los mamíferos la ovogénesis se inicia al comienzo del desarrollo fetal, de forma que se ha asumido tradicionalmente que la población final de ovocitos quedará establecida poco después del nacimiento, sin que se produzca la posterior producción de nuevos ovocitos (Fair, 2003). La ovogénesis se inicia durante la gastrulación, momento en el que se forman las células germinales primordiales, que se multiplicarán activamente a través de sucesivas divisiones mitóticas. Estas células precursoras migran, tanto en machos como en hembras, a las crestas genitales originando las células germinales (Tsang *et al.*, 2001). La diferenciación de células sexuales, ya sea hacia espermatozoides u ovocitos, se producirá posteriormente durante el desarrollo y está regulada por factores secretados en el tejido somático gonadal (Tsang *et al.*, 2001). Una vez completada la diferenciación del ovario, las células germinales primordiales proliferan quedando conectadas por puentes intercelulares y reciben el nombre de ovogonias (Picton *et al.*, 1998). Éstas replican su ADN e inician la meiosis, transformándose en ovocitos primarios, atraviesan las etapas de leptoteno, zigoteno y paquiteno de la profase I, hasta detenerse en el estadio de diploteno. Durante esta etapa los ovocitos muestran una sensibilidad extrema, por lo que una gran parte de los mismos degenera (Van den Hurk y Zhao, 2005). El inicio de la meiosis coincide con el comienzo de la folliculogénesis. El ovocito se rodea de una capa simple de células somáticas, dando lugar a los folículos primordiales. Estas células somáticas, precursoras de las células de la granulosa, son de origen mesotelial y/o mesonéfrico (Van den Hurk *et al.*, 1995) y disponen ya de la capacidad de secretar esteroides (Juengel *et al.*, 2002). La activación de los folículos primordiales se caracteriza por un cambio en la morfología de las células de la granulosa, transformándose de aplanadas a cúbicas, y por el inicio del crecimiento del ovocito. Estos cambios determinan la transformación de los folículos primordiales en primarios. La activación de los folículos primordiales está regulada por una compleja interacción entre factores estimuladores e inhibidores de origen local y/o sistémico (Van den Hurk y Zhao, 2005). El intercambio de señales moleculares entre el ovocito y las células que lo rodean resulta esencial durante el crecimiento y la diferenciación de ambos. Así, el ovocito es responsable del crecimiento folicular y de la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa, mientras que las células de la granulosa resultan indispensables para el crecimiento, la diferenciación y la maduración del ovocito.

Cuando las células de la granulosa proliferan generando un segundo estrato, dan lugar a los folículos secundarios o preantrales (Driancourt, 1991). Al mismo tiempo comienzan a secretar diferentes glicoproteínas, que al asociarse formarán la zona pelúcida (ZP). Esta estructura brindará protección primero al ovocito y más tarde al embrión, y desempeñará un papel destacado durante la fertilización (Van den Hurk y Zhao, 2005). Los folículos primordiales, primarios y secundarios aparecen en el ovario fetal de las hembras bovinas a los 90, 140 y 210 días post-concepción, respectivamente. Durante esta etapa el folículo presenta en esta especie un diámetro de 150 μm y el ovocito de 60 μm . El citoplasma del ovocito sufre una clara transformación apareciendo nuevos organelos (ribosomas, mitocondrias, gránulos de glucógeno, proteínas, lípidos), al tiempo que se reorganizan los previamente existentes. Las células que rodean al ovocito continúan proliferando e inician su diferenciación, apareciendo el cúmulo y las tecas, al tiempo que se forma una cavidad entre las células de la granulosa con contenido líquido, lo que supone la transición a folículo terciario o antral (Fortune et al., 2004). El fluido presente en el interior del antro, constituye una fuente de sustancias moduladoras y reguladoras, que derivan del plasma sanguíneo y de actividad secretora de las células foliculares. El aumento de la vascularización y de la permeabilidad de los vasos localizados la pared folicular, produce un aumento del tamaño del antro y del diámetro folicular. Cuando el folículo alcanza los 4 mm de diámetro, en la especie bovina, adquiere la capacidad de responder a los estímulos desencadenantes del reclutamiento, pudiéndose incorporar a una oleada de crecimiento folicular (Van den Hurk y Zhao, 2005). En la especie bovina el crecimiento folicular se produce en oleadas y en cada una de ellas se suceden las etapas de reclutamiento, selección y dominancia. El crecimiento inicial de los folículos antrales es independiente del estímulo gonadotrófico, pero a partir del momento en que alcanzan un diámetro de 4 mm se hacen sensibles a las gonadotrofinas. Así al inicio de cada oleada, un grupo de folículos (5 a 10 en la vaca) comienzan su crecimiento de manera gradual y regular, como respuesta a la elevación de la concentración sérica de Hormona Folículo Estimulante (FSH). La aparición de actividad aromatasa en las células granulosas permite la secreción de estrógenos a partir de los andrógenos producidos por las células de la teca, estimuladas por la Hormona Luteinizante (LH). En las especies monoovulares (vaca, yegua, humana, etc), solamente se transformará en folículo dominante uno de los inicialmente reclutados y continuará su crecimiento y diferenciación, adquiriendo la capacidad de ovular. Los factores intrafoliculares que han sido sugeridos como candidatos

para la regulación son aquellos relacionados con el sistema de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), esteroides, inhibina-A, activina-A, receptores de gonadotropinas, factores angiogénicos y otros factores intrafoliculares (Ireland *et al.*, 2004). Sin embargo, los únicos factores que han estado implicados temporalmente o funcionalmente son los IGF y su sistema asociado, el estradiol y los receptores de la hormona luteinizante (LH). El mecanismo que activa esos procesos bioquímicos no es claro, pero ocurre durante un descenso progresivo en las concentraciones circulantes de FSH y un incremento inicial en la LH (Beg y Ginther, 2006). El intervalo desde que empieza la disminución de los niveles de FSH y el inicio de la desviación es de 3 días en la vaca y la yegua. Después de haber iniciado la desviación, las concentraciones de FSH siguen bajando durante 10 a 20h en vaquillas y durante varios días en las yeguas (Ginther *et al.*, 2001). Se ha señalado también (Ginther *et al.*, 1996) que el folículo seleccionado suprime la secreción de FSH, dando como resultado final la pérdida de los folículos subordinados. Ciertos tipos de inhibina están relacionadas con la disminución de las concentraciones séricas de la FSH (Ginther, 2000). Sin embargo, no se han observado diferencias en la concentración total de inhibina, inhibina-A y -B y activina-A entre los tres folículos de mayor diámetro durante el proceso de selección (Austin *et al.*, 2001) o entre los dos folículos de mayor tamaño antes del inicio de la desviación en vacas (Beg *et al.*, 2002). Las concentraciones de inhibina-B no cambian antes de que comience la desviación. Cuando se elimina el folículo de mayor diámetro (FMD) al inicio de la desviación, las concentraciones de activina-A e inhibina-A aumentan en el segundo folículo más grande (FSD) pero lo hacen después de que esta estructura alcanza el diámetro característico del inicio de la desviación (Ginther *et al.*, 2002).

Las células de la granulosa del folículo antral seleccionado incrementan su contenido en receptores para la LH y FSH, volviéndose más sensibles y reactivas al efecto de las mismas. Así, la LH facilita que en muy pocos días el folículo seleccionado aumente su diámetro, adquiriendo así un tamaño muy superior a los restantes y alcanzando un diámetro final en un folículo primario de 15 a 20 mm. El folículo dominante contiene un ovocito en íntima asociación con un grupo compacto de células de la granulosa, dicha asociación se conoce con el nombre de complejo cúmulo ovocito (COC). Este complejo está bañado por el fluido folicular y conectado con las restantes células de la granulosa dispuestas en la pared interna del folículo (Van den Hurk y Zhao, 2005). En la hembras bovinas, se producen entre dos y tres oleadas sucesivas de crecimiento

folicular en el transcurso de cada ciclo estral (Günter, 2000). Sin embargo, la ovulación solamente se producirá cuando la presencia del folículo dominante coincida con la regresión del cuerpo lúteo. Tanto los folículos subordinados de cada onda folicular, como los folículos dominantes que no ovulan sufrirán atresia. El ovocito tiene la capacidad de reiniciar la meiosis de manera espontánea durante una parte importante de la foliculogénesis, pero dicha situación no se produce, indicando la existencia de un factor inhibidor. Esta sustancia, denominada factor inhibidor de la meiosis (OMI), todavía es desconocida, aunque se han propuesto diversos candidatos (TGF- β , AMH, activina, inhibina, follistatina). Las dificultades para su identificación pueden ser consecuencia de su extrema labilidad. El AMPc parece jugar también un papel destacado en el bloqueo de la meiosis (Downs *et al.*, 1993).

4.1.1. Interacciones del ovocito con las células foliculares.

Los ovocitos de los mamíferos crecen y evolucionan manteniendo un contacto íntimo e interdependiente con las células somáticas adyacentes. Tras la formación del antro las células de la granulosa se diferencian en dos tipos celulares distintos por sus características estructurales y funcionales: las células de la granulosa y las del cúmulo. Las células de la granulosa recubren la pared interna del folículo y tienen una función secretora principalmente esteroidogénica. Las células del cúmulo y el ovocito mantienen una comunicación bidireccional a través de las uniones comunicantes y mediante señales paracrinas. Durante mucho tiempo se consideraba que el ovocito actuaba de forma pasiva en su relación con las células somáticas del folículo. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que el ovocito desempeña un papel central en la regulación folicular, jugando un papel crítico en la regulación de la ovogénesis, la tasa de ovulación y la fecundidad (Eppig, 2001; Gilchrist *et al.*, 2004; McNatty *et al.*, 2004; Gilchrist y Thompson, 2007). El ovocito secreta una diversos factores de crecimiento ovocitarios (OSFs), que regulan la actividad de las células del cúmulo y de la granulosa. Se demostró la existencia de dos compuestos pertenecientes a la superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante (TGF), el factor de crecimiento-transformación 9 (GDF9) y la proteína morfogenética del hueso 15 (BMP15), que son necesarias para el inicio de la foliculogénesis y actúan durante la regulación de la diferenciación de las células del cúmulo y de la granulosa (Eppig *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2000) y en la regulación de su actividad (Elvin *et al.*, 1999; Joyce *et al.*, 2000; Otsuka *et al.*, 2001; Gilchrist *et al.*, 2008). Las células del cúmulo juegan, también, un papel crítico durante la maduración meiótica,

producen una gran cantidad de ácido hialurónico, que determina la mucificación y expansión del cúmulo (Chen *et al.*, 1990). No obstante, estas células mantienen algún tipo de comunicación con el ovocito, puesto que en el bovino su eliminación antes de la fertilización *in vitro* afecta a la penetración espermática y al posterior desarrollo embrionario (Zhang *et al.*, 1995; Fatehi *et al.*, 2002, Fernandez *et al.*, 2007). En la especie bovina, las células del cúmulo intervienen durante la fertilización atrayendo y atrapando los espermatozoides (Cox *et al.*, 1993), facilitando la capacitación espermática, la reacción acrosomal y la penetración (Fukui, 1990; Younis y Brackett 1991) o evitando el endurecimiento precoz de la zona pelúcida. La matriz extracelular mucoelástica que une a las células del cúmulo tras su expansión resulta esencial para su adhesión a los cilios del epitelio distal del oviducto, facilitando su captación y posterior transporte hacia la luz oviductal (Talbot *et al.*, 2003). La morfología de las células del cúmulo ha sido utilizada para seleccionar a los ovocitos destinados a la maduración *in vitro* y el grado de expansión del cúmulo se relaciona con la calidad del ovocito postmaduración, dado que las condiciones de cultivo favorables para la maduración suelen determinar, también, la expansión del cúmulo (Choi *et al.*, 2001). No obstante, existe bastante controversia en cuanto a la relación entre el grado de expansión del cúmulo y la competencia del ovocito (Ali y Sirard 2002, Luciano *et al.*, 2004).

4.1.2. Crecimiento folicular.

El folículo ovárico es la unidad estructural y funcional del ovario, proporcionando un ambiente adecuado para el crecimiento, eventual ovulación del ovocito que contiene y formación de un embrión a partir de la fertilización (Cortvrindt y Smitz, 2001; Findlay *et al.*, 2009). La foliculogénesis es un proceso altamente selectivo donde usualmente solo un folículo asume dominancia y el destino del resto de los folículos es la atresia mediada por apoptosis; el mayor tipo de células que sufren este proceso son las células de la granulosa (Hsueh *et al.*, 1994). El crecimiento y desarrollo de los folículos ováricos requiere de una serie de eventos coordinados destinados a inducir cambios morfológicos y funcionales dentro del folículo, con el fin de permitir el adecuado desarrollo del ovocito. El proceso secuencial de reclutamiento y selección de estos folículos, resulta en la producción de un número específico de folículos ovulatorios para cada raza y especie animal (Bonnet *et al.*, 2008). La formación del folículo primordial, la activación con la

consecuente formación del folículo primario y posteriormente del folículo secundario (folículos preantrales), la formación del folículo antral y por último la ovulación, son las principales etapas de la foliculogénesis. A la fecha hay poco conocimiento sobre los factores y mecanismos que controlan el desencadenamiento del crecimiento folicular; sin embargo hoy en día ya hay un consenso al respecto y algunos autores mencionan que la activación de los folículos primarios es controlada por factores intraováricos (Suss *et al.*, 1988). Las primeras señales de crecimiento del folículo primario son caracterizadas por el aumento de tamaño del ovocito, cambios en la estructura de las células de la granulosa de forma plana a cuboidal, formación de la ZP y la proliferación progresiva de las células de la granulosa. Los folículos primarios son formaciones compuestas por un ovocito que en la vaca alcanza un diámetro aproximado de 60 μm por una corona de células. De esta forma las células tecales parecen secretar factores que influyen la tasa de proliferación de las células de la granulosa (Duranthon y Renard 2001).

El crecimiento, maduración, ovulación y luteinización del folículo de Graff dependen de la secreción apropiada de la FSH y la LH. La FSH desempeña un importante papel en el inicio de la formación del antro, esta gonadotropina estimula la mitosis de las células de la granulosa (Hafez, 1995). El diámetro folicular juega un papel importante en la selección de ovocitos, ya que la competencia de los ovocitos bovinos para el desarrollo puede estar influenciada por el tamaño del folículo y por su calidad. Crozet *et al.*, 1995 sugieren que ciertos factores foliculares juegan un papel importante en la maduración citoplasmática y en consecuencia, en el desarrollo embrionario por lo que el ovocito que ha completado el crecimiento folicular experimenta una diferenciación posterior durante el desarrollo del folículo antral, que está directamente relacionado con la adquisición de la competencia para soportar el desarrollo embrionario temprano. Barnes *et al.*, (1991), sugirieron que los ovocitos procedentes de folículos de diámetro pequeño, a pesar de ser capaces de realizar la maduración nuclear, eran citoplasmáticamente inmaduros. De modo similar, Arlotto *et al.*, (1996) observaron que ovocitos bovinos de tamaño grande procedentes de folículos grandes tenían un potencial para el desarrollo mucho mayor que los ovocitos procedentes de folículos más pequeños, a pesar de tener el mismo potencial de maduración. En el bovino, los ovocitos originados a partir de folículos mayores de 6 mm de diámetro proporcionan un mayor porcentaje de blastocistos que los procedentes de folículos menores (Lonergan *et al.*, 1994). Sin embargo, porcentajes de eclosión idénticos sugirieron que los embriones derivados de folículos medianos y grandes son de

igual calidad biológica (Pavlok *et al.*, 1992). Normalmente, para la MIV de ovocitos bovinos, se emplean ovocitos obtenidos de folículos de 2 a 6 mm, mientras que *in vivo* los ovocitos que resumen la meiosis se originan a partir de folículos dominantes de 15 mm aproximadamente. Tales folículos habrían tardado alrededor de 5 días en crecer de 2 a 15 mm (Driancourt, 1991).

La adquisición de la competencia meiótica y para el desarrollo ocurre de manera progresiva en los ovocitos con el aumento de tamaño de los folículos y está correlacionada con la transcripción de la síntesis de ARN nuclear (Fair *et al.*, 1995; Moor *et al.*, 1987). Varias observaciones realizadas en diferentes especies animales han indicado que los ovocitos obtenidos de folículos de tamaño reducido son incapaces de reanudar la meiosis o se bloquean en el estadio de metafase I. Este hallazgo se ha comprobado en folículos de menos de 2 mm en bovinos (Fair *et al.*, 1995), caprinos (De Smedt *et al.*, 1994) y ovinos (Moor y Trouson, 1977).

Actualmente se conoce que durante el ciclo estral de las vacas o novillonas cebuínas y europeas ocurren de dos (Pierson *et al.*, 1988, Ginther y Knopf 1989; Figueiredo *et al.*, 1997) o tres (Savio *et al.*, 1988; Gambini *et al.*, 1998, Figueiredo *et al.*, 1997) ondas de crecimiento folicular.

Este proceso continuo de crecimiento y regresión de folículos que lleva al crecimiento del folículo preovulatorio es conocido como Dinámica Folicular, así como el Periodo de crecimiento y atresia de un grupo de folículos ovárico es denominado Onda de Crecimiento Folicular (Lucy *et al.*, 1992). Cada onda folicular está compuesta de 3 fases: reclutamiento, selección y dominancia (Figueiredo *et al.*, 1997).

La emergencia de la primera onda folicular es observada alrededor de un día y medio después de la ovulación (Adams *et al.*, 1992; Ginther *et al.*, 1997) cuando un conjunto de folículos antrales dependientes de FSH se comienza a desarrollar, se observa un aumento de la concentración plasmática de FSH que antecede de 1 a 2 días de la emergencia de cada onda folicular (Adams *et al.*, 1992). Existen diferencias en la dinámica folicular entre *Bos taurus* y *Bos indicus*, particularidad observada en el número de ondas de crecimiento folicular por ciclo estral, capacidad de secretar LH, área del tejido luteal, diámetro folicular en el momento de la divergencia y en la ovulación (Figueiredo *et al.*, 1997; Pinheiro *et al.*, 1998; Baruselli *et al.*, 2007). En novillas *Bos indicus* (Rhodes *et al.*, 1995, Figueiredo *et al.*, 1997, Viana *et al.*, 2000), reportan que la dinámica folicular es caracterizada por la presencia de dos ondas (33%) y tres ondas (57.1%), reportando

hasta cuatro ondas por ciclo en Brahman, Neloré y Gyr. Savio *et al.*, (1988), Sirois y Fortune (1988), Ginther *et al.*, (1989) y Wolfenson *et al.*, (2004), refieren que en animales de la raza Holstein (*Bos taurus*) predominan de dos a tres ondas por ciclo estral. Según Carvalho *et al.*, (2008), además de la diferencia en el número de ondas foliculares, las hembras *Bos indicus* reclutan mayor número de folículos por onda de crecimiento folicular que las hembras *Bos taurus*: 33.4 ± 3.2 versus 25.4 ± 2.5 , respectivamente. En hembras taurinas con dos ondas de crecimiento folicular el diámetro del folículo dominante es de 17.1 y 16.5 mm para la primera y segunda onda; en cebuínas, los diámetros fueron de 11.3 y 12.1 mm, respectivamente (Ginther *et al.*, 1989; Figueiredo *et al.*, 1997). Estudios realizados por Bó *et al.*, (1994), demuestran que entre el día uno a tres después del estro emerge una onda de folículos que varía de 10 a 50 con un tamaño de dos a tres milímetros, parte de los cuales continúan creciendo hasta los cuatro y seis milímetros, de estos, entre dos y cinco siguen creciendo según Ginther *et al.*, (1996), a partir de la transición de FSH a LH, donde ocurre la divergencia del folículo dominante (8.5 mm en taurinos y 6.2 mm en cebuínos) (Baruselli *et al.*, 2007), generando la regresión de los folículos menores, sin embargo, este folículo inicia su atresia luego de la fase estática. Para Silcoux *et al.*, (1993), en la primera onda de crecimiento folicular, la fase de crecimiento va desde la emergencia hasta cerca del octavo al décimo día y la fase de regresión ocurre después del décimo día, para hembras que presentan dos ondas de crecimiento folicular, mientras que en las de tres ondas de crecimiento folicular se tiene del sexto al séptimo día de estática y séptimo a octavo día de regresión. Según Savio *et al.*, (1988), Sirois y Fortune (1988), en animales que presentan ciclo estral de dos ondas de crecimiento folicular el reclutamiento de la primera onda es identificada en el día de la ovulación, al día tres el folículo dominante está presente alcanzando el diámetro preovulatorio a los seis días, este folículo permanece estático hasta el inicio de la segunda onda en el día diez después de la ovulación, donde se produce el folículo de Graaf y ovulatorio. Así mismo, refieren que en un ciclo de tres ondas foliculares la fase estática del folículo dominante de la primera onda folicular es más corta y la fase luteal es más larga, en estos casos la tercera onda se inicia al día 16 y de esta se produce la ovulación. Sin embargo Bó *et al.*, (1995), refieren que en el octavo día del ciclo estral (o sexto, por la variación en el número de ondas ocurre la emergencia de la segunda onda de crecimiento folicular y el proceso se reinicia; el folículo dominante de esa segunda onda regresiona (si hay tres ondas) o se torna folículo ovulatorio si solo ocurren dos

ondas. Variaciones en la dinámica folicular pueden deberse a factores como la dieta, manejo, producción de leche, periodo de lactancia, y postparto (Ginther *et al.*, 1996). La dieta puede afectar el patrón de ondas de crecimiento folicular, debido a que una nutrición pobre está asociada a bajas concentraciones de IGF-I circulante (Murphy *et al.*, 1990), reducción del diámetro del folículo dominante de todas las ondas y también reduce el tiempo de persistencia de este folículo durante la primera onda (Rhodes *et al.*, 1995). Así mismo Rhodes *et al.*, (1995), reportan que factores de tipo nutricional, de manejo y la época del año están relacionados con la dinámica folicular. Badinga *et al.*, (1994), involucran complejas interacciones neurohormonales del hipotálamo-hipófisis- ovarios.

4.1.3 Fluido Folicular

El fluido folicular constituye el ambiente bioquímico que rodea al ovocito durante su crecimiento y diferenciación. El fluido folicular tiene una gran variedad de funciones: bloqueo de la meiosis, protección frente a la proteólisis, extrusión durante la ovulación, estimula la motilidad y la reacción acrosomal (Rodríguez *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2001) y ejerce un efecto amortiguador frente a condiciones adversas (Gosden *et al.*, 1988). El antro folicular es un compartimiento avascular, separado del estroma ovárico por la pared folicular que constituye la barrera “hemato-folicular”. Este fluido es un trasudado procedente del plasma, pero, además, contiene diversos componentes específicos originados de la actividad secretora y metabólica de las células foliculares (Gérard *et al.*, 2002) y su composición varía de manera sustancial a lo largo de las distintas etapas del crecimiento folicular. El fluido folicular contiene una gran variedad de sustancias: electrolitos, proteínas, enzimas, factores de crecimiento, citoquinas, hormonas proteicas y esteroides, sustratos energéticos y otros factores de naturaleza desconocida. El conocimiento de la composición del fluido folicular podría contribuir al diseño de medios de maduración mejor adaptados a las necesidades de los ovocitos durante este periodo y por ello se mencionan algunas de las características relativas a la composición de este fluido. El fluido folicular contiene cloruro, calcio, magnesio, zinc, cobre y fosfato inorgánico, en concentraciones similares a las observadas en el plasma y en el suero. Sin embargo, los niveles de sodio y potasio son más elevadas, lo que demuestra la existencia de sistemas de transporte activo. El contenido total en proteínas es inferior al existente en el suero, representando un 75% del mismo, y no varía significativamente en función del tamaño folicular. Este menor contenido en proteínas es debido a que tienen un peso

molecular superior a 250,000 daltons y por ende son incapaces de atravesar la barrera hemato-folicular; sin embargo, la permeabilidad de esta barrera se incrementa a medida que progresa el crecimiento folicular, lo que determina que cuanto mayor es el diámetro del folículo mayor es, también, su contenido en proteínas de alto peso molecular. El fluido folicular contiene diversas enzimas y su cantidad aumenta durante la evolución folicular. Entre ellas destacan: lactato deshidrogenasa, la ATPasa, las transaminasas y la fosfatasa alcalina. Además, contiene hialuronidasa, endopeptidasa y alagenasa, enzimas que desempeñan un papel destacado en el momento de la ovulación. El fluido folicular contiene glucosa y lactato y sus niveles varían en función del tamaño folicular, así durante las primeras etapas la concentración de glucosa es inferior a la observada en el suero, mientras que la de lactato es superior, pero al incrementarse el tamaño del folículo la concentración de glucosa aumenta, mientras que la de lactato disminuye (Leroy *et al*, 2004). La glucosa juega un importante papel en el metabolismo intrafolicular, puesto que constituye la principal fuente de energía, siendo utilizada en anaerobiosis para la producción de lactato (Leese y Lenton, 1990; Boland *et al.*, 1994; Rabiee *et al.*, 1997, 1999). Los niveles de triglicéridos también están condicionados por el tamaño folicular, disminuyendo a medida que se incrementa el diámetro del folículo. Así, en los folículos de menor tamaño sus niveles superan a los presentes en el suero, mientras que en los de mayor tamaño son significativamente inferiores (Leroy *et al*, 2004), lo que sugiere que están condicionados por procesos metabólicos locales. Además, la concentración de triglicéridos en el fluido folicular se mantiene constante y es independiente de las fluctuaciones ocasionadas por la situación metabólica del animal o los cambios en su dieta (Wehrman *et al.*, 1991). Los triglicéridos presentes en el fluido folicular pueden servir como una fuente de energía alternativa, puesto que las células cultivadas *in vitro* los utilizan. Sin embargo, los ovocitos y los embriones cultivados en un medio que contiene triglicéridos muestran una gran acumulación de lípidos (Kim *et al.*, 2001, Abe *et al.*, 2002). Los niveles de ácidos grasos no esterificados son similares a los del suero y no se modifican en función del tamaño del folículo. La concentración intrafolicular de colesterol representa el 42% de la sérica y su valor se incrementa con el tamaño folicular. El colesterol intrafolicular está ligado a lipoproteínas de alta densidad, puesto que la fracción fijada a las de baja densidad no es capaz de atravesar la barrera hemato-folicular. En los mamíferos el fluido folicular contiene hormonas esteroideas y proteicas. Los niveles de FSH y LH son similares o ligeramente inferiores a los observados en el suero, mientras

que la cantidad de estradiol presente en los folículos preovulatorios bovinos es bastante elevada (1 µg/ml) en el momento de la descarga preovulatoria de LH. Sin embargo, dicha concentración se reduce notablemente al cabo de 6 h coincidiendo con la rotura de la vesícula germinal.

4.1.4. Maduración nuclear y citoplasmática del ovocito.

La maduración del ovocito implica el reinicio de la meiosis y la progresión hacia el estadio de metafase II (maduración nuclear) y una serie de sucesos citoplasmáticos (morfológicos, funcionales y bioquímicos) necesarios para la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (Eppig *et al.*, 1994). La secuencia correcta de estos eventos es muy importante ya que la habilidad del ovocito para ser fertilizado y desarrollarse normalmente depende tanto de la maduración nuclear como citoplasmática (Hurtt *et al.*, 2000). La maduración citoplásmica, comprende los cambios ultraestructurales que ocurren en el ovocito durante el crecimiento folicular desde el estadio de vesícula germinal hasta MII (Ducibella *et al.*, 1994; Shamsuddin, 1993). Estos cambios ultraestructurales incluyen la migración de la vesícula germinal cerca a la zona pelúcida, la síntesis y acumulación de los diferentes tipos de RNA, ribosomas y polipéptidos (Withaker, 1996), localización de las mitocondrias en la periferia del ovocito, aumento en el número de aparatos de Golgi y en los niveles de glutatión, translocación de los gránulos corticales desde el centro del ovocito hacia la periferia y su unión a la membrana plasmática (Fair *et al.*, 1997). Durante el crecimiento folicular el ovocito adquiere la competencia meiótica, la cual se refiere a la capacidad del ovocito para completar el ciclo meiótico o maduración nuclear. Esta es adquirida progresivamente durante el crecimiento folicular y está estrechamente relacionada con el tamaño del ovocito (110 µm) y éste a su vez con el tamaño del folículo (2 a 3 mm) (Fair *et al.*, 1997; Fair *et al.*, 2001). El ovocito se encuentra detenido en profase de la meiosis I, desde la vida embrionaria hasta que se da el pico preovulatorio de FSH y LH; en respuesta a éste, la meiosis continúa hasta metafase II, estadio en el que ocurre el segundo arresto meiótico. Como consecuencia el folículo expulsa un ovocito completamente maduro (ovulación) y apto para ser fecundado (Withaker, 1996). Este proceso de continuación de la meiosis involucra la desintegración de la envoltura nuclear llamada Vesícula Germinal (VG) condensación de cromosomas, formación del huso en metafase I, separación de cromosomas homólogos con expulsión del primer cuerpo polar y freno en metafase II (Fair *et al.*, 1997; Kubelka *et al.*, 1998;

Salomone *et al.*,2001). El ovocito de bovino requiere un periodo de 24 h para completar únicamente la maduración nuclear *in vitro* (Sirard, 1989). Durante la continuación de la meiosis estimulada por el pico preovulatorio de FSH y LH, los niveles de AMPc intraovocito descienden debido a la disminución de la expresión de conexinas formadoras de las uniones comunicantes (Calder *et al.*, 2003), las cuales son necesarias para la difusión del AMPc desde las células de la granulosa al ovocito, y por la hidrólisis del AMPc a su forma inactiva 5'-AMP (Conti *et al.*, 2002). Las hormonas gonadotrópicas FSH y LH se unen específicamente a receptores transmembranales acoplados a proteínas G, la cual está conformada por tres subunidades, alfa – beta – gama, y en su forma inactiva se encuentra asociada a Guanosina Difosfato (GDP). Al unirse la hormona a su respectivo receptor, se genera un cambio conformacional que permite la interacción con varias proteínas G, induciendo la liberación del GDP y la unión por Guanosina Trifosfato (GTP). Esta última interacción estimula el desacoplamiento del complejo subunidad alfa – GTP que activará la adenil ciclasa, enzima que cataliza la producción de 3', 5'-adenosina monofosfato cíclico (AMPc) a partir del adenosina trifosfato (ATP). Los altos niveles de AMPc en las células de la granulosa inducen la mucificación caracterizada por el desacoplamiento de las uniones comunicantes (Calder *et al.*, 2003) y la secreción de ácido hialurónico (Salustry *et al.*, 1998), disminuyendo los niveles de AMPc intraovocito, el cual es el principal factor involucrado en el freno meiótico, permitiéndolo la continuación de la meiosis y por tanto la maduración nuclear (Tsafiri *et al.*, 1996).

En el bloqueo meiótico, el ovocito es detenido en profase I (estadio VG) debido al efecto inhibitorio de la PKA mediado por el AMPc. Esta inhibición es realizada en dos niveles: Evitando la activación del pre-Factor Promotor de la Maduración (pre-FPM) por la fosforilación de p34cdc2 y reprimiendo la síntesis de *nov*o de ciclina B1. Después de la liberación del ovocito del folículo ovárico, las concentraciones de AMPc intraovocito disminuyen y el pre-FPM se activa. La poliadenilación del RNAm de Mos es posterior a la activación del FPM, conduciendo a la expresión de Mos y la activación de proteína kinasa activada por mitógenos (MAPK). La inactivación de FPM en metafase I (MI) es necesaria para la expulsión del primer cuerpo polar, mientras que su reactivación al inicio de la segunda división meiótica evita la entrada a interfase. El bloqueo del ovocito en metafase II es mantenido hasta la fertilización por la acción de las MAPK y el FPM (Josefsberg *et al.*, 2002). El ovocito reiniciará la Meiosis II, solamente si es fecundado por el espermatozoide (Figuereido *et al.*, 2002). En condiciones *in vivo* el reinicio de la meiosis

de la maduración ocurre después de un pico preovulatorio de la hormona LH durante el estro, y momentos antes de la ovulación se observan modificaciones citoplasmáticas. En este mecanismo se encuentran involucradas una serie de modificaciones en número, tamaño, posición de organelos como la migración periférica de los gránulos corticales, así como de síntesis de proteínas (Suss *et al.*, 1988). Por lo contrario, en los procedimientos de fertilización *in vitro*, el proceso de meiosis se retoma espontáneamente como consecuencia de la aspiración del ovocito (Mayes y Sirard 2001; Goncalves *et al.*, 2002). Los ovocitos que no tienen una sincronía entre la maduración nuclear y la maduración citoplasmática no serán fecundados, o bien, su desarrollo embrionario no llegará a término (Blondin y Sirard 1995).

4.1.5. Factores que interfieren en la competencia de los ovocitos.

El crecimiento del ovocito dentro de un folículo ovárico está determinado por un gran número de factores que influyen sobre su viabilidad y competencia para el desarrollo embrionario (Fair *et al.*, 1995). Dentro de estos factores están incluidos: el tamaño folicular (Hendrisken *et al.*, 2000; Lonergan *et al.*, 1994) y las diferentes fases del ciclo estral (Matchatkova *et al.*, 1996).

Hendriksen *et al.*, (2000), observaron que la competencia para el desarrollo *in vitro* se ve favorecida en los ovocitos obtenidos de folículos de 6 a 8 mm, en comparación con los folículos de 3 a 6 milímetros de diámetro; es decir, folículos mayores de 6 mm poseen ovocitos con mayor potencial para formar blastocistos que los folículos pequeños menores de 3 mm de los cuales regularmente se obtienen ovocitos incompetentes (Pavlok *et al.*, 1992), de tal forma que la competencia del ovocito aumenta en la medida que el folículo se desarrolla (Kruip *et al.*, 2000). Por lo tanto los bajos porcentajes de desarrollo de los ovocitos provenientes de folículos pequeños pueden estar relacionados con el hecho de que estos no han alcanzado completamente la Meiosis y/o competencia citoplasmática, o tal vez sean provenientes de folículos atrésicos (Camargo *et al.*, 2006). De la misma forma Fair *et al.*, (1995) y Pavlok *et al.*, (1992) demostraron que los ovocitos provenientes de folículos con menos de 2 mm de diámetro obtuvieron una tasa de maduración nuclear menor que aquellos ovocitos provenientes de folículos de más de 3 mm, que corresponden a un ovocito con un diámetro de aproximadamente 100 μ .

Varios estudios han demostrado que la fase del ciclo estral influye sobre la competencia ovocitaria, Machatkova *et al.*, (1996) observaron diferencias al obtener

ovocitos mediante aspiración en las diferentes etapas del ciclo estral. Así, ovocitos colectados entre los días 14 al 16 del ciclo estral, presentaban mejores índices de competencia para el desarrollo hasta blastocisto comparados con aquellos que fueron aspirados entre los días 7 al 9.

Hageman (1999) y Machatkova *et al.*, (2004) concluyeron que el desarrollo hasta blastocisto es significativamente mayor en ovocitos que fueron obtenidos durante la fase de crecimiento folicular, que aquellos obtenidos durante la fase de dominancia, independientemente del diámetro del folículo. La competencia ovocitaria aumentó en aquellos ovocitos obtenidos a partir de folículos mayores (Camargo *et al.*, 2006).

Otro aspecto importante es que los ovocitos aspirados de animales prepúberes poseen una menor actividad metabólica (Krisher *et al.*, 2007) y por lo tanto son menos competentes para la producción *in vitro* de embriones bovinos, con respecto a aquellos ovocitos obtenidos de animales adultos (Revel *et al.*, 1995). De la misma forma los ovocitos obtenidos sin estimulación hormonal a la donadora y con aspiraciones por lo menos 1 vez por semana son de menor calidad que aquellos en que las donadoras son aspiradas 1 vez cada 2 semanas (Goodhand *et al.*, 1999).

La estimulación hormonal puede alterar el ambiente folicular que rodea al ovocito, influenciando directamente la calidad del ovocito aspirado (Roth *et al.*, 2002). El uso de la hormona FSH antes de la aspiración beneficia el desarrollo embrionario sincronizando la población folicular, adelantando el desarrollo de los folículos e iniciando la maduración *in vivo* de los ovocitos, lo que llevaría a un aumento de la competencia del ovocito antes de su obtención (Gibbons *et al.*, 1994).

También intervienen en la calidad de los ovocitos otros factores como son aquellos implicados directamente en los animales y las condiciones medioambientales (Snijders *et al.* 2000). En un estudio realizado en Irlanda se encontró que vacas de alto valor genético produjeron ovocitos de menor calidad que sus compañeras de hato con un valor genético inferior. Estos hallazgos podrían tener relevancia para encontrar respuestas en el conocido problema de tasas reducidas de fecundidad en los hatos lecheros de mayor rendimiento productivo (Gordon, 2003). Así mismo, existen numerosas evidencias que demuestran que el estrés térmico puede alterar el desarrollo de los ovocitos y su calidad. Esta situación es especialmente marcada en el ganado vacuno lechero, debido a su mayor sensibilidad al estrés térmico como consecuencia de la alta demanda metabólica asociada a la lactación. En estos animales la capacidad de los ovocitos para ser

fecundados y soportar posteriormente el desarrollo embrionario está disminuida durante los períodos del año en los que se producen situaciones de estrés térmico (Zeron *et al.*, 2001; Al-Katanani *et al.*, 2002; Sartori *et al.*, 2002). Así, una elevada temperatura ambiental en los 10 días que preceden al momento del celo induce un descenso de la fertilidad (Al-Katanani *et al.*, 1999). También se ha podido comprobar una reducción en la producción de esteroides por parte de las células de la teca y de la granulosa en las vacas expuestas a estrés térmico durante 20-26 días (Roth *et al.*, 2001a). Estos mismos investigadores comprobaron que la recuperación de la fertilidad que se produce durante el otoño puede verse acelerada mediante la eliminación de los folículos reclutados durante el verano, aspirando los folículos con un diámetro comprendido entre 3-7 mm de durante cuatro ciclos estrales consecutivos (Roth *et al.*, 2001b), mecanismos a través de los cuales el estrés térmico compromete la función ovocitaria incluyen alteraciones en el crecimiento y la función folicular (Roth *et al.*, 2000), en la secreción de esteroides (Ozawa *et al.*, 2005; Roth *et al.*, 2001a; Wolfenson *et al.*, 1997) y en la expresión génica (Argov *et al.*, 2005).

Uno de los efectos del estrés térmico en ganado lechero es provocar un incremento del número de folículos de tamaño mediano y pequeño, cuyo reclutamiento podría ser consecuencia del descenso de la concentración de inhibina y del incremento de la secreción de FSH (Roth *et al.*, 2000). El ovocito permanece susceptible a los daños ocasionados por el estrés térmico durante todo el período de crecimiento preovulatorio, y los daños ocasionados durante este período parecen implicar la generación de ROS, ya que los efectos ocasionados por el estrés térmico, tanto *in vivo* (Roth *et al.*, 2008) como *in vitro* (Lawrence *et al.*, 2004) fueron atenuados mediante la adición de antioxidantes. La apoptosis juega un papel crítico en los efectos ocasionados por el estrés térmico sobre la maduración de los ovocitos bovinos. Una parte importante de los complejos cúmulo-ovocito expuestos a elevadas temperaturas (aproximadamente un 15-30%) desarrollan apoptosis, tal y como se ha determinado por técnicas de TUNEL (Roth y Hansen 2004 a,b); Soto y Smith 2009). Así, cuando los ovocitos son madurados *in vitro* a una temperatura elevada, es posible inhibir la apoptosis mediante un inhibidor de la caspasa (Roth y Hansen 2004a), la esfingosina 1-fosfato (Roth y Hansen 2004b) o el péptido BH4 (Soto y Smith 2009), manteniendo la competencia de los ovocitos para ser fecundados y soportar el inicio del desarrollo.

4.2 Fertilización.

La fertilización es el proceso de la reproducción sexual en el que se unen un ovocito y un espermatozoide y comienza cuando el semen es depositado en el tracto reproductor de la hembra. La fertilización de un ovocito comprende una serie de eventos que ocurren en un orden cronológico y que llevan a la incorporación del material genético del espermatozoide en el citoplasma del ovocito, dando origen a la formación de un cigoto (Alberts, 2002). Cuando los gametos se ponen en contacto en el oviducto de la hembra ocurren una serie de eventos sucesivos que conducen a la fertilización, a la formación de un cigoto y posteriormente al desarrollo de un nuevo individuo que tiene un contenido genético diferente al de los progenitores (Austin y Short, 1982).

El ovocito es transportado en la dirección correcta por las secreciones del oviducto, por el movimiento de los cilios que lo recubren y por contracciones musculares de la pared del oviducto, de este modo los ovocitos alcanzan el sitio de la fertilización que en la mayoría de los mamíferos es en el ampulla (Austin y Short, 1982).

Antes de establecer contacto con el ovocito, el espermatozoide penetra a través de las Células del Cúmulo (CC) éstas se expanden antes de la ovulación para permitir el paso de los espermatozoides, siendo esta característica un indicio externo de la maduración del ovocito (Yanagimachi, 1994). Los mecanismos por los cuales los espermatozoides atraviesan las CC no son claros. Hay algunas hipótesis que indican que el movimiento mecánico es indispensable para la penetración de esta estructura, sin embargo hay evidencias de que las enzimas contenidas en el acrosoma como la hialuronidasa y acrosina, pueden ser las responsables de la capacidad de penetración (Talbot *et al.*, 2003).

La ZP en los mamíferos tiene diversas funciones como el reconocimiento especie-específico con el espermatozoide, la inducción de la reacción acrosomal y como un primer mecanismo para evitar la poliespermia (Talbot *et al.*, 2003).

Durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, la ZP protege al embrión, sin ella los blastómeros podrían disociarse, o adherirse a las paredes del oviducto y perecer, además ayuda a la implantación del embrión en el útero. También funciona como una barrera de protección contra bacterias, leucocitos y ataque inmunológico. La ZP esta conformada por una serie de glicoproteínas que varían en su peso molecular dependiendo de la especie (Wassarman, 1989).

Los espermatozoides que han penetrado las CC se unen a la ZP por medio de la interacción de las moléculas de la superficie de ambas células. Una vez que el espermatozoide se une a la ZP debe atravesarla, se han postulado dos explicaciones a este proceso, una de ellas indica que la fuerza mecánica del espermatozoide es capaz de romper los puentes disulfuro de las glicoproteínas de la ZP. La otra supone que los espermatozoides que no llevan a cabo la reacción acrosomal no pueden penetrarla y que la acrosina hidroliza todas las glicoproteínas de la ZP (Austin y Short, 1982).

Una vez que el espermatozoide ha pasado a través de la ZP, cruza rápidamente el espacio perivitelino, su cabeza se une a la membrana plasmática del ovocito y el cuerpo completo se incorpora al citoplasma. En los bovinos la región ecuatorial de la membrana plasmática del espermatozoide es la que se fusiona con el oolema. La región posterior de la cabeza y cola son incorporadas por medio de la fusión de sus membranas con el oolema y la región anterior de la cabeza con la parte interna del acrosoma expuesta, es fagocitada por el ovocito (Yanagimachi, 1994).

Al fusionarse el espermatozoide con el ovocito, se produce una serie de eventos morfológicos y bioquímicos que constituyen el proceso de activación y por consiguiente el inicio del desarrollo embrionario. En los mamíferos la prueba más clara de que el ovocito ha sido activado es la liberación de los gránulos corticales (GC) para impedir el acceso de espermatozoides adicionales (bloqueo a la poliespermia). Al fusionarse el espermatozoide con el oolema, se activa la ruta del inositoltrifosfato que provoca un aumento de Ca^{+2} en el citosol, esta reacción se inicia desde la región donde ocurrió la penetración y se extiende al resto del ovocito. La liberación de los iones de Ca^{+2} produce la exocitosis de los GC. En la mayoría de las especies los ovocitos que no son fertilizados no se activan y el huso metafásico se desintegra; sin embargo en algunos ovocitos, cuando envejecen puede haber una activación espontánea (Alberts, 2002). En algunas especies de mamíferos la activación de los ovocitos puede lograrse mediante la estimulación eléctrica o mecánica y dividirse por partenogénesis sin la participación del espermatozoide, llevando a cabo las primeras divisiones embrionarias antes de que perezcan (Austin y Short, 1982; Gilbert, 2000).

4.3. Producción de embriones mediante fertilización *in vitro*

En el proceso de MIV, los ovocitos aun inmaduros retoman la Meiosis cuando son retirados del ambiente folicular (Bever e Izadyar, 2002, Lonergan *et al.*, 2003) ya que se

eliminan las sustancias inhibitorias presentes en el líquido folicular (Sirard *et al.*, 2006). Por lo tanto, los ovocitos deben ser colocados rápidamente en un medio de cultivo adecuado. Los ovocitos inmaduros se pueden obtener por punción folicular de los ovarios provenientes de rastro o bien por aspiración folicular guiada por ultrasonido en animales vivos. En general los ovocitos son obtenidos de folículos de 2 a 8 mm de diámetro, este tamaño se debe a que está demostrado que el crecimiento del ovocito se completa cuando el folículo alcanza un tamaño de alrededor de 2 mm, por lo tanto ovocitos provenientes de folículos menores de 2 mm serían incompetentes para completar la maduración y el desarrollo embrionario (Yang *et al.*, 1998; Lonergan *et al.*, 1994; Lequarre *et al.*, 2005). La calidad de las células del cúmulo es esencial pues ellas poseen un papel importante en la maduración citoplasmática del ovocito ya que proveen de los aminoácidos, carbohidratos y nucleótidos necesarios (Nagano *et al.*, 2006, Rodríguez y Farin, 2004). La interacción directa del ovocito con las células del cúmulo ocurre a través de las uniones de comunicación que están compuestas de proteínas del tipo de las conexinas, por lo tanto la ruptura de estas uniones afectaría la maduración del ovocito (Nagano *et al.*, 2006).

La apariencia del citoplasma del ovocito también puede ser un factor determinante para el éxito de la MIV, los ovocitos con citoplasmas uniformes en color y textura presentan mayores porcentajes de fertilización que aquellos que tienen citoplasmas oscuros (Nagano *et al.*, 2006).

El establecimiento de un medio de MIV eficiente que promueva una correcta maduración es un factor importante. Para la MIV del ovocito bovino normalmente se utiliza el medio TCM 199 con sales Earle. Por otro lado algunos grupos de investigación han utilizado el SOF también para la MIV de los ovocitos. Lonergan *et al.*, (2004) observaron que es posible llevar a cabo la MIV con SOF en ausencia de macromoléculas. Por el contrario Russell *et al.*, (2006) demostraron que ovocitos madurados con SOF, generan embriones de menor calidad a aquellos madurados en medio TCM-199. Estos medios pueden ser modificados de acuerdo con los protocolos de cada laboratorio, pudiendo ser suplementados con diferentes fuentes de energía: Glucosa o Piruvato, fuentes proteicas: SFB y BSA o macromoléculas sintéticas como alcohol polivinílico (PVA) y polivinilpirrolidona (PVP) (Ali y Sirard, 2002), bicarbonato de sodio; L-glutamina; hormonas LH y FSH (Goncalves *et al.*, 2001, Sirard *et al.*, 2007); antioxidantes; factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) (Makarevich y

Markkula, 2002). También se puede suplementar el medio con otras sustancias de maduración (roscovitine, butirolactona-1) que detienen la Meiosis, como una función para aumentar el tiempo para completar la maduración citoplasmática del ovocito *in vitro*, y por lo tanto mejorar su competencia (Rodríguez y Farin, 2004).

Además el pH y la osmolaridad del medio, así como la temperatura de la incubadora afectan también el éxito de la MIV (Nagai, 2001).

La etapa siguiente de la MIV es la FIV en la cual el éxito depende de la calidad de los ovocitos y de la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides (Hansen, 2006).

Para el cultivo de embriones se emplean varios medios que deben ser suplementados con proteínas, sustratos energéticos, aminoácidos esenciales y no esenciales. El uso de SFB en el medio de cultivo embrionario como fuente proteica ha sido considerado como el responsable de algunos casos en los que se han presentado anomalías fetales y placentarias, así como el nacimiento de becerros con peso excesivo (síndrome del becerro gigante), que son causa de distocias (Hoshi, 2003).

En la actualidad se han estado utilizando nuevos suplementos con el objetivo de sustituir al SFB, entre ellas se encuentran la albúmina, o macromoléculas como PVA y PVP (Enright *et al.*, 2000). A pesar de esto, se sabe que la presencia de SFB en los medios aumenta el porcentaje de producción de blastocistos (Gutiérrez-Adán *et al.*, 2001); sin embargo, se desconoce la concentración de ácidos grasos, factores de crecimiento, aminoácidos y vitaminas que están presentes en el SFB ya que esta puede variar entre los lotes y afectar de forma variada el desarrollo de los embriones. La fuente de energía requerida para suplir las necesidades de los embriones en las primeras divisiones hasta la formación de 16 a 32 células son el piruvato y el lactato. Después de la compactación y formación del blastocelo cuando se inicia la diferenciación de las células del embrión, se debe utilizar Glucosa como sustrato energético (Rieger *et al.*, 1992). Actualmente diversos sistemas han sido empleados con el objetivo de mimetizar las condiciones uterinas, mejorando los porcentajes de PIV de embriones.

El cultivo *in vitro* de los embriones ha sido objeto de estudio por numerosos investigadores durante los últimos 30 años. Sin embargo, todavía quedan muchos aspectos por resolver en relación a los efectos de las condiciones de cultivo sobre el desarrollo embrionario y en las características anatómicas y fisiológicas de los fetos y neonatos generados a partir de embriones producidos *in vitro*. A pesar de que los embriones de los mamíferos tienen una gran plasticidad, lo que les permite sobrevivir en

condiciones muy diferentes, los embriones producidos *in vitro* son de menor calidad y tienen menor viabilidad que los producidos *in vivo* (Lane, 2001). Existen diferentes sistemas de cultivo embrionario que pueden ser clasificados en tres categorías de acuerdo a su formulación: indefinidos, cuando se utiliza suero y/o cultivo con células somáticas; semidefinidos cuando se omite el co-cultivo y el suero se reemplaza por albúmina sérica y definidos, cuando la fuente protéica se reemplaza por proteínas químicamente puras (ej. Albúmina recombinante) o macromoléculas sintéticas como el polivinil alcohol o la polivinil pirrolidona.

Uno de los componentes principales de los medios indefinidos es el suero sanguíneo, debido a que aporta numerosas sustancias que favorecen el desarrollo embrionario: aminoácidos, vitaminas, factores de crecimiento y sustratos energéticos. No obstante, también contamina el medio con factores embriotóxicos (Bavister, 1995). El suero ejerce un efecto bifásico que es negativo durante las primeras etapas del desarrollo, al inhibir las primeras divisiones celulares, pero es positivo en etapas posteriores, estimulando el desarrollo embrionario temprano (Bavister, 1995). Así, la adición de suero mejora la cinética del desarrollo embrionario (Lequarre *et al.*, 2003; Rizos *et al.*, 2003), el porcentaje de cigotos que se desarrollan hasta blastocisto y el número de células que constituyen éstos (Holm *et al.*, 2002; Lazzari *et al.*, 2002). Sin embargo, la presencia de suero durante el cultivo aumenta el acumulo de lípidos, reduce la resistencia a la criopreservación (Abe *et al.*, 2002), altera la expresión génica (Rizos *et al.*, 2003; Wrenzycki *et al.*, 2001). Además se ha relacionado con la aparición de numerosas alteraciones fenotípicas observadas durante la gestación y la vida postnatal, como alteraciones placentarias y síndrome de exceso de volumen fetal (McEvoy, 2003; Young *et al.*, 1998).

Las células somáticas favorecen el desarrollo embrionario eliminando algunas sustancias embriotóxicas presentes en el medio de cultivo (Bavister *et al.*, 1992; Pinyopummintr y Bavister, 1991), produciendo sustancias que favorecen multiplicación o la diferenciación celular (Bavister *et al.*, 1992). Sin embargo, a pesar de estas ventajas, su utilización provoca algunos inconvenientes. En primer lugar constituyen una fuente de variación al utilizarse tipos celulares muy diferentes procedentes de distintas especies. Además, estas células constituyen un riesgo de incorporar patógenos al cultivo, ya que se ha demostrado que son susceptibles a la contaminación por virus como los de la diarrea vírica bovina (Waldrop *et al.*, 2004) y el herpesvirus bovino tipo 1 (Vanroose *et al.*, 1999).

Estos hechos llevaron al desarrollo de sistemas de cultivo semidefinidos en los que se reemplazó el suero por albúmina sérica y en los que no se utilizaba el cultivo con células somáticas. La albúmina es una proteína abundante en el tracto genital de los mamíferos, que podría desempeñar un papel nutritivo durante el desarrollo embrionario temprano (Thompson, 2000). Algunos estudios permitieron demostrar que los embriones bovinos pueden ser cultivados en medios con concentraciones muy bajas de Albúmina Sérica Bovina (BSA) (Krisher *et al.*, 1999) y que los embriones producidos en estas condiciones soportaban mejor la criopreservación (Rizos *et al.*, 2003). Sin embargo, la BSA es de origen biológico, por lo que puede ser objeto de contaminación y no se conocen sus efectos sobre el desarrollo.

Algunos investigadores demostraron que los embriones bovinos podían desarrollarse en medios libres de proteína (Holm *et al.*, 1999; Keskinetepe *et al.*, 1995; Pinyopummintr y Bavister, 1991), lo que permitió desarrollar medios de cultivo definidos. Estos medios tienen la ventaja de evitar los efectos nocivos del suero, la albúmina y los cultivos, y al mismo tiempo permiten realizar estudios para conocer las necesidades de los embriones durante su desarrollo temprano. No obstante, en este sistema de cultivo se obtienen menos blastocistos que en los sistemas indefinidos o semidefinidos (Kuran *et al.*, 2001; Lonergan *et al.*, 1999; Orsi y Leese, 2004), lo que ha limitado su utilización a escala comercial. Se han diseñado multitud de medios simples para mejorar el cultivo de los embriones bovinos y controlar mejor las condiciones de cultivo: SOF (Tervit *et al.*, 1972; Krisher *et al.*, 1998), CR1aa y CR2 (Rosenkrans y First, 1991), CZB (Ellington *et al.*, 1990), KSOM (Erbach *et al.*, 1994), G1.2 y G2.2 (Gardner, 1994), BECM (Dobrinisky *et al.*, 1996; Lim *et al.*, 1999), G1 (Krisher *et al.*, 1999), y IVD101 (Abe y Hoshi, 2003).

Estos medios han sido suplementados con diversos componentes con objeto de satisfacer las necesidades de los embriones, incluyendo los siguientes: Aminoácidos, debido a su efecto benéfico durante el desarrollo embrionario temprano (Pinyopummintr y Bavister, 1996); Factores de crecimiento para mejorar el porcentaje de blastocistos (Byrne *et al.*, 2002; Sirisathien *et al.*, 2003) y el porcentaje de implantación (Block y Hansen, 2007); Glutación, Superóxido dismutasa o Taurina, Cisteamina y Mercaptoetanol, como antioxidantes; EDTA (Olson y Seidel, 2000b) o Desferrioxamina (Harvey *et al.*, 2007) como quelantes; Vitaminas (Olson y Seidel, 2000a), citrato sódico y mioinositol (Holm *et al.*, 1999); así como hialuronato (Stojkovic *et al.*, 2002; Palasz *et al.*, 2006).

La Glucosa es el principal sustrato energético de las células, no obstante produce algunos efectos nocivos durante el desarrollo embrionario temprano (Bavister, 1995). Durante las primeras etapas los embriones prefieren como sustratos energéticos el lactato y el piruvato (Pinyopummintr y Bavister, 1996) existiendo una elevada oxidación de lactato hasta la etapa de 8 células (Khurana y Niemann, 2000). La utilización de Glucosa se incrementa a partir de la compactación, siendo metabolizada a lactato (Sinclair *et al.*, 2003). En las etapas iniciales del desarrollo embrionario, la Glucosa inhibe la fosforilación oxidativa a través de los metabolitos procedentes de la glucólisis (Bavister, 1995). Además, cuando la concentración de Glucosa es elevada se incrementa la proporción de machos (Bredbacka y Bredbacka, 1996) al retardar el desarrollo de los embriones de sexo femenino. Este efecto podría ser causado por la expresión diferencial de algunos genes ligados al cromosoma X (Bredbacka y Bredbacka, 1996; Kimura *et al.*, 2005). Sin embargo, la supresión de la Glucosa del medio de cultivo no parece ser la mejor solución, ya que es un sustrato imprescindible para la síntesis de Ribosa y la producción de NADPH (Bavister, 1995; Thompson, 2000), por ello se utilizan medios con baja concentración de Glucosa.

Las secreciones oviductales contienen diversos aminoácidos que pueden ser utilizados por los embriones (Bavister, 1995) y su presencia en los medios de cultivo libres de proteínas favorece el desarrollo embrionario (Pinyopummintr y Bavister, 1991). Sus acciones biológicas son muy diversas pudiendo actuar como antioxidantes (Liu y Foote, 1995) y controlando el pH y la osmolaridad (Gardner, 1998). No obstante, el metabolismo de los aminoácidos produce amonio, que es nocivo para los embriones. Este efecto secundario obliga a renovar el medio cada dos o tres días (Thompson, 2000).

También se ha comprobado que los factores de crecimiento secretados por las células estimulan el desarrollo embrionario cuando se añaden a medios de cultivo definidos (Byrne *et al.*, 2002; Sinclair *et al.*, 2003). El factor de crecimiento epidérmico (EGF) favorece la maduración nuclear y la segmentación (Rieger *et al.*, 1998), así como el desarrollo embrionario (Sirisathien *et al.*, 2003) y la síntesis de proteínas (Byrne *et al.*, 2002; Sirisathien *et al.*, 2003). El factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) y 2 (IGF-2) aumenta el porcentaje de blastocistos y el número de células (Byrne *et al.*, 2002; Sirisathien *et al.*, 2003) y reduce la apoptosis.

La utilización de sistemas de cultivo semidefinidos y definidos ha puesto de manifiesto que la tensión de oxígeno utilizada durante el cultivo es un factor crítico para el

desarrollo embrionario (Lonergan *et al.*, 1999; Vanroose *et al.*, 2001). La elevada tensión de oxígeno afecta a la transición materno-cigótica incrementando la duración del cuarto ciclo celular (Lequarre *et al.*, 2003). Además, la utilización de una baja tensión de oxígeno reduce la formación de radicales libres que afectan al desarrollo y metabolismo embrionario (Lane, 2001), provocan un incremento de la apoptosis (Yuan *et al.*, 2003) y alteran la expresión génica (Harvey *et al.*, 2004). Además, los embriones cultivados en una atmósfera con 5% de oxígeno resisten mejor la criopreservación (Rizos *et al.*, 2003). Sin embargo, el cultivo en una atmósfera con 5% de oxígeno produce una reducción de la proporción de células de la masa celular interna (Fischer-Brown *et al.*, 2002). La tensión de oxígeno influye también en el desarrollo de los embriones después de la transferencia. Así, se ha comprobado que fetos producidos a partir de embriones producidos en una atmósfera con 20 % de oxígeno tienen mayor peso que los producidos con 5% (Iwata *et al.*, 2000) y los cotiledones tiene mayor tamaño y área en los primeros (Fischer-Brown *et al.*, 2005), siendo especialmente marcado en el caso de los embriones cultivados en KSOM. Algunos autores señalan que la utilización de un único medio durante todo el periodo de cultivo impide la consecución de buenos resultados. Esto es consecuencia de que las necesidades de los embriones cambian a lo largo de su desarrollo, por lo que se han diseñado sistemas de cultivo secuenciales, cuyos resultados parecen prometedores. El diseño de los medios secuenciales permite cambiar de piruvato, nutriente preferido durante las primeras segmentaciones, a Glucosa cuando la demanda energética es mayor al producirse la blastulación y la diferenciación celular (Harvey, 2007). Además, permiten ajustar la disponibilidad de aminoácidos añadiendo aminoácidos no esenciales durante las primeras etapas e incorporando además los aminoácidos esenciales una vez producida la activación del genoma.

En la especie bovina se han utilizado el KSOM/SOF (Nedambale *et al.*, 2004), eSOF-98/LSOF-98 (Thompson, 2000), SOF1/SOF2 (Steeves y Gardner, 1999), y SOF-A/SOF-B (Gyu-Jin *et al.*, 2007). Se ha propuesto la utilización comercial del sistema G1.2/G2.2 para el cultivo de los embriones bovinos (Lane *et al.*, 2003a), sin embargo, su elevado costo limita su utilización.

Se han diseñado sistemas de cultivo en microfluidos, construidos a escala de los embriones de los mamíferos. Estos sistemas permiten eliminar la mayor parte del trabajo al permitir automatizar los cambios en los medios de cultivo y reducen el estrés ambiental. Los embriones pueden ser movidos de una localización a otra simulando la migración del

oviducto al útero ajustando el flujo de fluido (Wheeler *et al.*, 2004). Las dimensiones de los sistemas de cultivo en microfluidos permiten que la cantidad de medio que rodea al embrión sea mucho más reducida (aproximadamente 0.125 µl) que la que se utiliza en los sistemas de cultivo estáticos (50 µl). Este reducido volumen permite una manipulación muy precisa del ambiente que rodea a los embriones de forma estática o dinámica (Wheeler *et al.*, 2004). El principal inconveniente del cultivo en microfluidos es la elección del plástico debido a sus diferentes grados de permeabilidad para el agua y los gases, lo que se puede solucionar reduciendo los canales de flujo y los volúmenes de medio (Thompson, 2007). Sin embargo, estos medios todavía necesitan ser mejorados sensiblemente, puesto que el cultivo de los embriones bovinos producidos *in vitro* en el interior del oviducto incrementa notablemente la calidad de los mismos.

4.4. Obtención de ovocitos.

Los ovarios contienen un elevado número de folículos que se encuentran en diferentes estados de desarrollo (primordiales, en crecimiento, atrésicos), de los cuales solamente una pequeña proporción va a ser utilizada durante la vida reproductiva del animal. La recolección de ovocitos permite recuperar y aprovechar folículos no ovulatorios, que bajo condiciones fisiológicas se tornarían en folículos atróficos, con el fin de aprovechar el máximo potencial genético de una donadora por procedimientos *in vitro* (Baldassarre *et al.*, 1996).

Hay dos formas para obtener los ovocitos, dependiendo del objetivo final de producción:

1. La obtención de ovocitos procedentes de ovarios de animales de rastro es la forma más común y económica de obtener los ovocitos con fines experimentales. Es la que ha dado paso al desarrollo de la producción de embriones de bovino *in vitro* y su producción en gran escala (Palma, 2001). El transporte de los ovarios al laboratorio puede hacerse en solución fisiológica o PBS con antibióticos a temperatura ambiente. Yang *et al.*, (1998) estudiaron el efecto del tiempo de conservación de los ovarios a una temperatura de 24-25 °C y concluyeron que durante al menos 11 h no disminuía significativamente la viabilidad de los ovocitos obtenidos. Otro trabajo concluyó que la conservación de ovocitos procedentes de ovarios a 10 °C durante 24 h no afectó a la maduración nuclear ni al posterior desarrollo embrionario tras la fertilización *in vitro* (FIV), activación partenogénica o transferencia nuclear (Matsushita *et al.*, 2004). El método más empleado

para la obtención de los COC es el de aspiración con el empleo de agujas unidas a jeringas hipodérmicas o a bombas de aspiración. Los tamaños más usados de las agujas de aspiración varían entre 18 a 21 G de diámetro, y de 2 a 2.5 cm de longitud.

2. El uso de aspiración guiada por ultrasonido (OPU, siglas en inglés del término ovum pick-up), permite obtener ovocitos a partir de los ovarios de hembras donadoras *in vivo*. Con esta técnica se ha incrementado la producción de embriones de una donadora determinada mediante la maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos (Brogliatti y Adams, 1996). La OPU se utiliza principalmente para obtener ovocitos a partir de hembras adultas, pero también es posible coleccionar ovocitos de hembras jóvenes (becerras prepúberes), y al producir embriones de éstas se logra acortar el intervalo generacional. La OPU también permite obtener ovocitos de los ovarios de hembras gestantes, hasta el tercer mes de gestación (Brogliatti y Adams, 1996; Merton *et al.*, 2009; Taneja *et al.*, 2000). En el año 2005, los embriones producidos a partir de ovocitos obtenidos por OPU representaron el 30% del total de embriones transferidos en el mundo, siendo Brasil el país responsable del 50% de esta producción (Thibier, 2006).

Cuando se usan ovocitos coleccionados de ovarios provenientes de rastro o por OPU, los gametos recolectados de folículos de un tamaño de 3 a 6 mm de diámetro se encuentran inmaduros y deben ser incluidos en los protocolos de maduración *in vitro* (Marquant *et al.*, 1998).

4.4.1. Selección de los ovocitos.

Diversos criterios han sido empleados por los diferentes autores para evaluar la calidad del ovocito siguiendo diferentes esquemas de clasificación. Sin embargo, la mayoría de los autores se basan en la selección de ovocitos siguiendo parámetros visuales de valoración de la morfología del COC, el aspecto del citoplasma ovocitario y tamaño del ovocito. Otros métodos de selección previos a la obtención de ovocitos también han sido empleados, como la selección en función del diámetro folicular y la selección con base en la morfología del ovario. El primer trabajo que se conoce en bovinos sobre selección de ovocitos basándose en sus características morfológicas es el publicado por Leibfried y First (1979). Numerosos autores han descrito que la presencia de un cúmulo intacto alrededor del ovocito y una apariencia homogénea del ooplasma son indicadores de ovocitos inmaduros con capacidad para madurar y desarrollarse (Gordon y Lu, 1990; Leibfried y First, 1979; Xu, 1987). Por otro lado, Shioya *et al.*, 1989 demostraron

que los ovocitos desnudos (aquellos que no presentan células del cúmulo alrededor del ovocito), presentan una capacidad reducida para la maduración, fertilización y posterior desarrollo embrionario.

Las células del cúmulo son importantes en la maduración ya que hay una estrecha relación entre estas y los ovocitos, ya que le proporcionan nutrientes y energía. Se sabe que a través de ellas hay transporte de aminoácidos, nucleótidos y precursores de fosfolípidos necesarios para el ovocito (Wani *et al.*, 2002).

La evaluación de los ovocitos se realiza con base en su apariencia citoplasmática y el número de capas de células foliculares que lo rodean, clasificándose en cuatro categorías o grados de calidad (adaptado de: Baldassarre *et al.*, 1994; De Loos, 1984; Wani *et al.*, 1999, 2000).

1 = Excelente: Ovocitos esféricos y simétricos, de tamaño, color y textura uniforme, rodeados de tres a cinco capas completas de células del cúmulo (complejo cúmulo-corona completo).

2 = Buena: Ovocitos esféricos y simétricos; tamaño, color y textura uniforme, pero con pérdida parcial de las capas del cúmulo (complejo cúmulo-corona incompleto).

3 = Regular: Ovocitos esféricos y simétricos; de tamaño, color y textura uniforme, pero sólo con el recubrimiento de las células de la corona radiada.

4 = Mala: Complejo cúmulo-ovocito totalmente degenerado u ovocitos totalmente desnudos.

4.5. Maduración *in vitro*.

Tan pronto como se ha separado el ovocito de su ambiente folicular, los ovocitos espontáneamente reinician la meiosis en cultivo, pero esta maduración es incompleta, debido a que no están capacitados para inducir una descondensación completa de la cabeza espermática después de su fertilización (Sirard y Coenen, 1993). Por lo tanto, la maduración debe realizarse tanto nuclearmente como citoplasmáticamente, nuclearmente debe observarse la expulsión del corpúsculo polar lo que indica que el ovocito se encuentra en MII. Sin embargo, la evaluación de la maduración citoplasmática es más compleja. Se han utilizado diversos métodos como histoquímica de lectina que permite observar la distribución de los gránulos corticales (Hosoc y Siya, 1995), detección de los niveles de calcio, migración mitocondrial o contenido de glutatión, aunque la prueba definitiva es la capacidad de los ovocitos en MII, para llevar a cabo el desarrollo

embrionario hasta la etapa de blastocisto en condiciones *in vitro*. Aunque también es cierto que influyen otros factores que no tienen que ver con la maduración citoplasmática.

El medio más tradicional y más empleado en la maduración de ovocitos de vacuno es el TCM-199 (Tissue Culture Medium 199), que está compuesto por sales de Earle con bicarbonato, suplementado con piruvato, lactato, vitaminas, aminoácidos, purinas y proteínas (albúmina bovina o suero).

4.6. Fertilización *in vitro*.

Para que se lleve a cabo la fertilización es necesario: que los ovocitos hayan madurado correctamente y hayan alcanzado la MII, que el semen haya sido capacitado y se lleve a cabo la RA, y que se utilicen los medios y las condiciones adecuadas (Gordon, 1994).

Para la FIV se recomienda usar semen de machos con fertilidad probada, ya sea fresco o congelado. La FIV incluye un procedimiento para capacitar a los espermatozoides con los que se inseminan los ovocitos. Para la capacitación *in vitro* de los espermatozoides se siguen principalmente dos procedimientos, el Percoll y el swim-up. El primero se basa en la realización de un lavado por centrifugación (a través de dos gradientes de concentración), y el segundo en periodos de incubación en los cuales los espermatozoides capacitados se dirigen hacia la superficie del medio de capacitación, y esta parte se centrifuga para conseguir el paquete celular que se utilizará para la fertilización (Wani, 2002).

Estos métodos también separan el plasma seminal y eliminan las sustancias inhibitoras de la capacitación, haciendo posible seleccionar a las células espermáticas de mejor calidad y contar con espermatozoides capacitados para colocarlos con los ovocitos durante la FIV (Gordon, 1994).

Después de que el semen ha sido capacitado, se procede a calcular la concentración adecuada para llevar a cabo la FIV. No hay una concentración predeterminada de semen para la FIV, pero la calidad del mismo puede servir como guía para recomendar el uso de una concentración eficiente, siendo importante al determinar su calidad evaluar el porcentaje de espermatozoides muertos. La dosis de semen más adecuada para la fertilización va de 0.5×10^6 a 1×10^6 espermatozoides por ml de medio de FIV (Ward *et al.*, 2002).

4.6.1. Preparación del semen para la fertilización *in vitro*.

Tanghe *et al.*, (2002) demostraron que la centrifugación con gradientes de Percoll fue fundamental para la separación de espermatozoides aumentando el porcentaje de células vivas y con alta actividad mitocondrial, de los toros utilizados en la FIV. Además de esto, ellos observaron una mejora en los espermatozoides con bajo porcentaje de fertilización.

Prakash *et al.*, (1998) demostraron que para humanos el Percoll proporcionó una mayor concentración de espermatozoides morfológicamente normales en relación a la técnica de swim-up. Para bovinos la concentración espermática también fue mayor cuando se utilizó la técnica de gradientes de Percoll en relación con el swim-up (Somfai *et al.*, 2002). El gradiente de Percoll fue importante para seleccionar espermatozoides con más movimiento y aumentar el porcentaje de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto y morfológicamente normales (Moohan *et al.*, 1995; Fernandes *et al.*, 2008). Según Parrish *et al.*, (1995), para obtener una tasa de recuperación de espermatozoides móviles con la técnica de Percoll es necesario que los tiempos de centrifugación sean cortos. Se ha demostrado que con la técnica de swim-up se obtienen mayores porcentajes de penetración de ovocitos en relación al Percoll, en cuanto a la producción de blastocistos en día 7 se obtiene mayor número cuando se utiliza Percoll que swim-up (Cesari *et al.*, 2006). Por otro lado Parrish *et al.*, (1995) observaron que el desarrollo de mórula y blastocisto no fue diferente al comparar los métodos de separación espermática Percoll y swim-up.

4.7. Desarrollo de embriones *in vitro*.

Después de transcurridas las 18 a 24 h de la FIV, se evalúa el proceso para realizar el cambio de los ovocitos al medio de desarrollo y seguir con el cultivo de los embriones *in vitro*.

Hasta el año 2000, los medios más utilizados para la producción de embriones fueron el TCM-199 y Menezo B2, junto con sistemas de co-cultivo y con 10 % de SFB. Posteriormente se utilizaron medios semi-definidos para el desarrollo embrionario, como el SOF-citrato y 5 % de FCS. Sin embargo, en los últimos años es común utilizar medios definidos o semi-definidos, ya que se ha comprobado que los medios completamente definidos y libres de proteínas resultan ser eficientes para el desarrollo embrionario (Krisher *et al.*, 1998; Long *et al.*, 2003).

Dentro de los suplementos utilizados en los medios de desarrollo para bovinos, se encuentran el SVE (Murzamadiev *et al.*, 1983) y la BSA (Gardner *et al.*, 1994). Los

derivados de fluidos corporales, como el FCS y la BSA son los más utilizados. Tanto el suero como la BSA contienen una mezcla indefinida de proteínas, factores de crecimiento o péptidos, que estimulan el crecimiento embrionario. Estos derivados, al igual que el co-cultivo con células somáticas permiten conseguir porcentajes aceptables de desarrollo embrionario. En los primeros medios de desarrollo usados en los sistemas de co-cultivo en borregos y vacas, se usaron células de oviducto, pero se ha demostrado que diversas células somáticas son capaces de proveer un sistema de cultivo efectivo para las necesidades de los embriones (Gordon, 1994).

4.7.1. Criterios de evaluación de la calidad del embrión bovino producido *in vitro*.

Es sabido que los embriones producidos *in vitro* presentan varias diferencias en relación a aquellos producidos *in vivo*, por ejemplo la cantidad de lípidos es mayor, tienen mayor sensibilidad a las bajas temperaturas, mayor número de células apoptóticas, más anormalidades cromosómicas, menor cantidad de blastómeros, así como presentar diferencias en su metabolismo, entre otras (Rizos *et al.*, 2002a).

La morfología y el porcentaje de blastocistos han sido criterios utilizados para la evaluación de la competencia del desarrollo embrionario. La viabilidad de los embriones puede ser medida por otras formas tales como la coloración de los blastómeros, la cinética de desarrollo, el diámetro del embrión a eclosionar, el número total de células, la criotolerancia, el análisis del metabolismo basado en los niveles de transcripción del RNAm por la técnica de PCR, además de la capacidad del embrión de establecer una gestación (Rizos *et al.*, 2002a).

4.8. Suplementación proteica para MIV y CIV.

Actualmente los centros de investigación buscan la utilización de medios definidos donde el conocimiento de su composición posibilite la eliminación de una serie de sustancias y productos que influyen en el desarrollo embrionario. La maduración del ovocito en un medio sin fuente de proteína es perjudicial al desarrollo embrionario (Eckert y Niemann, 1995).

Las condiciones de cultivo durante la PIV de embriones bovinos pueden impactar de alguna manera en el desarrollo potencial del embrión. El cultivo de los embriones según Lonergan *et al* (2006) es particularmente importante, pues en este periodo ocurren

diversos eventos como: primera división de la fertilización, activación del genoma embrionario, compactación de la mórula y la formación del blastocisto.

A pesar de que el suero y la albúmina son comúnmente adicionados a los medios como fuentes proteicas para mejorar la eficacia del cultivo se han realizado muchas investigaciones con diferentes sustitutos del suero y del BSA por macromoléculas definidas, los resultados obtenidos con estos sustitutos siguen siendo inconsistentes e inferiores a los obtenidos con proteínas séricas (Nedambale *et al.*, 2004).

4.8.1. Requerimientos del embrión durante el cultivo *in vitro*.

El estudio de la fisiología embrionaria preimplantación ha permitido establecer que el embrión tiene dos períodos que marcan una diferencia clara en la forma como funciona y se regula su metabolismo. Antes de formar la mórula las células embrionarias se están dividiendo pero se mantienen separadas unas de otras en lo que se conoce como el período pre-compactación. En este período cada célula funciona independientemente y no existen mecanismos de regulación sofisticados como los que se encuentran en los organismos multicelulares. Al formar la mórula las células no sólo se dividen sino que forman nexos entre ellas, entrando al período post-compactación, que coincide con la llegada del embrión al útero. De esta manera el embrión requiere y por lo tanto desarrolla mecanismos de regulación y homeostasis que le permiten controlar su ambiente interno (Gardner y Lane, 1997).

Los requerimientos metabólicos del embrión de menos de 8 células (etapa pre-compactación) son marcadamente diferentes a sus requerimientos luego de esta etapa, a medida que se acerca al estado de blastocisto (etapa post-compactación). El embrión en desarrollo presenta bajos niveles de biosíntesis, poca actividad respiratoria y una capacidad limitada para utilizar la Glucosa como fuente de energía (Brinster y Thompson, 1996; Epstein y Smith, 1973). A su vez estas tres facetas se ven aumentadas a medida que se acerca más al estado de blastocisto. Estos cambios del metabolismo dictan que la estrategia a seguir para obtener embriones con alta capacidad de desarrollarse e implantarse es la de acomodar los medios de cultivo a las necesidades cambiantes durante su desarrollo hasta la etapa de blastocisto (Gardner y Lane, 1997).

La Glucosa ha tomado un papel protagónico entre los conocimientos actuales sobre el metabolismo del embrión. Existe una tendencia a eliminar la Glucosa de los medios de cultivo embrionario que se basa en la premisa de que el embrión en etapa de segmentación parece utilizar aminoácidos y ácido carboxílico, más no la Glucosa como

fuerza de energía (Leese, *et al.*, 1991). Esta última puede incluso causar un freno en el desarrollo del embrión en etapa de desarrollo cuando se incluye en los medios de cultivo simples (Quinn, 1995), al disminuir su capacidad oxidativa. Además, parece ser que *in vivo* el ovocito y el cigoto están expuestos a un ambiente con muy baja concentración de Glucosa (Gardner, 1996). Con la activación del genoma embrionario, la actividad biosintética del embrión aumenta y por ende este requiere de Glucosa en ciertas etapas de la síntesis de ácidos nucleicos (Morgan y Faik, 1981; Reitzer, *et al.*, 1980). Por esta razón aunque se ha logrado cultivar embriones hasta el estado de blastocisto en medios sin Glucosa (Quinn, 1995), estos son de menor calidad y viabilidad cuando se comparan con los cultivados en medios con Glucosa (Gardner y Lane, 1996).

De la adición de aminoácidos a los medios de cultivo antes del estado de 8 células se asocia con una disminución en la viabilidad de los embriones de ratón. Sin embargo luego del estado de 8 células, los aminoácidos esenciales generan un aumento en el porcentaje de desarrollo de la masa celular interna. A su vez los aminoácidos no esenciales han demostrado tener un efecto acelerador del desarrollo, aumentando la viabilidad en los embriones en estado 8 células. Estos últimos se han relacionado con un efecto estimulador de la formación del blastocelo y de la masa celular interna (Lane y Gardner, 1997).

4.8.2 Acumulación de lípidos y su relación con el SFB.

La presencia de lípidos intracelulares en ovocitos y embriones ha sido demostrada ampliamente (Diez *et al.*, 1996; Dobrinsky *et al.*, 1996). Los lípidos están presentes en los ovocitos y realizan diferentes funciones en el desarrollo embrionario (Mc Evoy *et al.*, 2000). Kim *et al.*, (2001) demostraron que los lípidos desempeñan un importante papel para el almacenamiento de energía, en la estructura celular y modificando las propiedades metabólicas y biológicas de la membrana. Se han llevado a cabo diferentes investigaciones en diferentes especies domésticas para comprender el metabolismo de reserva de los lípidos y su uso en los ovocitos y embriones, ya que estos son un factor limitante durante la criopreservación (Diez *et al.*, 1996; Dobrinsky *et al.*, 1996; Mc Evoy *et al.*, 2000).

Se han realizado diferentes investigaciones para conocer el metabolismo, el tipo de lípido, las cantidades en ovocitos y embriones bovinos, porcinos (Ferguson y Leese, 1999). Se ha demostrado que los embriones bovinos metabolizan proteínas, lípidos y

glicógeno desde el Cigoto hasta el estadio de Blastocisto (Partridge *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 1996). De los lípidos contenidos dentro de los embriones porcinos se ha visto que los más abundantes son los triglicéridos (Coull *et al.*, 1997; Mc Evoy *et al.*, 2000).

Embriones porcinos y bovinos han sido estudiados a través de Cromatografía de gases, para determinar la composición de ácidos grasos se ha confirmado la presencia abundante de Fosfolípidos y triglicéridos (Mc Evoy *et al.*, 2000).

Ferguson y Leese (1999) usando microscopía de fluorescencia cuantificaron el contenido de triglicéridos en ovocitos y embriones bovinos producidos *in vitro* en presencia o ausencia de suero fetal bovino (SFB) durante el cultivo *in vitro*. El contenido inicial de triglicéridos en los ovocitos inmaduros fue de 59 ± 1.37 nmol/mg antes de la maduración comparado con 46 ± 0.85 nmol/mg después de 24h de maduración *in vitro* con medio suplementado con SFB. Los embriones cultivados en presencia de SFB disminuyeron la cantidad de triglicéridos 34 ± 0.92 nmol/mg durante el estadio de 2 células pero la cantidad de triglicéridos aumentó en los estadios de 8 células, hasta blastocisto (62 ± 1.14 nmol/mg). Sin embargo, embriones cultivados sin SFB en el medio no mostraron cambios en la concentración de triglicéridos ($33 \pm$ nmol/mg).

La cantidad de Triglicéridos en los embriones producidos en ausencia de suero no varía si son comparados con aquellos obtenidos *in vivo* (33 ± 0.70 ng). En contraste la cantidad de triglicéridos se ve aumentada a partir del estadio de 8 células cuando los embriones son cultivados en presencia de SFB, esta cantidad es prácticamente el doble cuando se compara con los embriones producidos en medios libres de suero. La disminución de triglicéridos durante la maduración y su posterior aumento cuando comienza el estadio de 8 células indica que estos juegan un papel metabólico en los ovocitos, lo que indica que son una fuente de energía durante el desarrollo embrionario (Isachenko *et al.*, 1998).

Los embriones desarrollados en un medio suplementado con suero, muestran diferencias morfológicas principalmente a la acumulación excesiva de gotas de lípidos intracelulares. Utilizando cromatografía de gases, Kim *et al.*, (2001) evaluaron el contenido de lípidos y ácidos grasos presentes en ovocitos bovinos inmaduros y madurados *in vitro* en presencia o ausencia de suero, encontrando que las concentraciones de triglicéridos varían, de esta forma se encontró que en presencia de

suero, la concentración de triglicéridos es mayor que cuando no se utiliza el SFB (36.6 vs 27.7 pmol respectivamente).

4.9. Diferencias de Ovocitos y embriones entre Razas.

Durante mucho tiempo han sido reportadas diferencias en la eficiencia reproductiva entre ganado *Bos indicus* y *Bos taurus* (Abeygunawardena y Dematawewa, 2004; Chenoweth *et al.*, 1994). El periodo de gestación es mayor en hembras Brahman que hembras de razas europeas o continentales (292 vs 285 días). Además los animales *Bos indicus* presentan un ciclo estral al inicio de la pubertad más corto y menos intenso que las hembras *Bos taurus* (Reynolds; 1963). Los porcentajes de preñez de embriones criopreservados también se ha visto que son diferentes entre razas *Bos indicus* y *taurus*. Estas observaciones al parecer están estrechamente relacionadas con el contenido de gotas lipídicas intracitoplasmáticas en los embionres. Seidel *et al.*, (2006) demostraron que los embriones con gotas lipídicas grandes presentan una criotolerancia reducida desde el estadio de mórula.

El manejo nutricional así como las condiciones ambientales son los principales factores que controlan la reproducción en el ganado. El medio ambiente (temperatura, clima, humedad, alimentación) puede producir cambios en la función del ovario, lo que puede resultar en la alteración de los niveles circulantes de Triglicéridos y Colesterol (Adamiak, 2005). Los cambios metabólicos en el suero sanguíneo debido a los cambios ambientales, se ven reflejados en la composición bioquímica del fluido folicular, lo que afecta directa o indirectamente al ovocito (Leroy *et al.*, 2004).

Las dietas altas en energía aumentan las concentraciones de Colesterol y Triglicéridos en diferentes razas de bovinos (Leroy *et al.*, 2004). Leroy *et al.*, (2005) encontraron que los embriones provenientes de vacas Holstein en lactación son más oscuros que los embriones de vacas lactantes de raza Belgian Blue. Se ha visto que los embriones con apariencia más oscura presentan excesiva acumulación de lípidos citoplasmáticos (Abe *et al.*, 1999; 2002). Leroy *et al.*, (2004) encontraron que cuando se da el aumento de tamaño folicular (pequeño-grande) las concentraciones de Colesterol se ven aumentadas de igual forma pero las concentraciones de Triglicéridos disminuyen, lo cual está estrechamente relacionado con el contenido intracelular de lípidos en los ovocitos.

4.10. Determinación del contenido lipídico en ovocitos y embriones.

El contenido de lípidos puede ser cuantificado a través de la utilización de diferentes metodologías. El entendimiento de los lípidos y su metabolismo en ovocitos y embriones puede ayudar a mejorar los procesos de criopreservación, lo cual ayudaría a obtener mejores porcentajes de preñez post descongelación.

Diversas partículas procedentes de los fluidos y tejidos biológicos pueden ser separadas a través de la utilización de gradientes de densidad. Los medios para la separación por gradientes de densidad han sido desarrollados desde la década de 1960 (Pertoft, 2000) y han sido utilizados en diferentes áreas de investigación.

Se ha utilizado también la Cromatografía de Gases para la evaluación del contenido de lípidos presentes en ovocitos y embriones. Kim *et al.*, (2001) analizaron el contenido de lípidos y su composición en ovocitos obtenidos *in vivo* e *in vitro*, en medios suplementados con suero y también en aquellos libres de suero (Mc Evoy *et al.*, 2000, Ryuchi *et al.*, 1999).

También han sido utilizados ensayos enzimáticos para medir el contenido de Triglicéridos. Ferguson y Leese (1999), y Sturmey *et al.*, (2003) evaluaron el contenido de Triglicéridos en ovocitos y embriones bovinos y porcinos usando microscopía de fluorescencia. Sin embargo este procedimiento es difícil de llevar a cabo.

La composición ultraestructural de los lípidos en ovocitos y embriones también puede realizarse utilizando tinciones específicas. Tominaga *et al.*, (2000) evaluaron la morfometría ultraestructural de las gotas lipídicas en cigotos, mórulas y blastocistos bovinos producidos *in vivo*, e *in vitro* usando microscopía electrónica de Transmisión después que los embriones fueron teñidos con Sudan Black. Kikuchi *et al.*, (2002), evaluaron las características morfológicas de las gotas lipídicas en ovocitos porcinos durante la fertilización y desarrollo embrionario hasta su desarrollo a blastocisto procedentes de cultivos *in vitro* y obtenidos *in vivo*, utilizando la tinción de Azul de Toluidina y microscopía electrónica de transmisión (MET). La combinación de ciertas tinciones con el uso de la MET puede ayudar a determinar el tamaño, densidad de las gotas lipídicas intracelulares en los embriones.

Ballard (2007) reportó la evaluación del contenido de lípidos intracelulares en ovocitos en etapa de MII, en ganado *Bos indicus* y *Bos taurus*, combinando la tinción de Rojo Nilo con una técnica de flotación en gradientes de densidad en Sacarosa.

V. MATERIAL Y METODOS.

5.1. Selección de Donadoras.

Antes del sacrificio en el Frigorífico y Empacadora de Tabasco, se llevó a cabo la clasificación y selección de las vacas donadoras de ovocitos, tomando en cuenta las características fenotípicas en cada grupo racial que se resumen en el Cuadro 1 (Gasque-Gómez, 2008).

Cuadro 1. Características fenotípicas en ganado bovino de dos grupos raciales (Gasque-Gómez, 2008).

Atributos	Tipo Cebuino	Tipo Europeo
Apariencia	Corpulentos, musculosos y sin grasa subcutánea. Esqueleto y huesos largos, finos	Voluminosos, con abundante masa muscular y grasa. Esqueleto de huesos medios cortos y gruesos
Temperamento	Activo, vivaz	Tranquilo, apático
Conformación		
Cabeza	Proporción mediana, larga, estrecha	Proporcionalmente pequeña, corta y ancha
Orejas	Largas, aguzadas, móviles y/o pendulosas	Cortas, no pendulosas
Cuernos	Grandes, fuertes excepto en Nelore	Cortos, finos
Cuello	Mediano y largo	Corto a mediano
Línea Dorsal	Cruz alta y dorlo lomo algo más bajo	En una sola línea horizontal
Tórax	Algo estrecho pero profundo y largo	Amplio y con costillas bien arqueadas
Pecho	Estrecho y profundo	Ancho y profundo
Espaldas	No muy musculosas	Musculosas
Grupa	Ancha, corta e inclinada	Amplia, horizontal
Cuarto Posterior	Musculoso	Muy desarrollado
Cola	Implantada alta, larga, con forma de látigo	Inserción a nivel, corta y gruesa
Giba	Implantada en la cruz o dorso, muy voluminosa	Carece de giba
Extremidades		
Miembros	Largos de huesos finos	Medios-cortos y de huesos gruesos
Piel (cueros)	Fino y de mayo área, formando pliegues colgantes en papada y prepucio	Textura espesa, por lo general sin pigmentar, aunque algunas razas si la tienen pigmentada
Pelaje	Pelos cortos, finos, lacios, suaves	Pelos realtivamente largos, ondulados o cortos y ásperos
Color	Piel negra y pelos blancos, grises, colorados o negros	Piel rosada y en claros de pelos, en algunas razas negras

5.1.1. Obtención de ovarios.

Para realizar este trabajo se utilizaron ovarios de vacas y novillonas sexualmente maduras, de los grupos raciales *Bos indicus* (*Bi*), *Bos taurus* (*Bt*) y *Bos indicus* x *Bos taurus* (*Bi* x *Bt*), sin considerar su estado reproductivo, recién sacrificadas. Los ovarios se retiraron aproximadamente 10 min después del sacrificio y fueron transportados al Laboratorio de Fertilización *in vitro* de la empresa Brasuca *in vitro* ubicada en Villahermosa, Tabasco, México, en un período máximo de 2 hr, conservándolos a una temperatura de 25 a 28 °C, en solución salina fisiológica (SSF) (NaCl 0.9% en agua destilada) adicionada con 100 UI por mililitro de antibióticos (Penicilina-Estreptomicina, P/E). En el laboratorio se lavaron dos veces con SSF a temperatura ambiente (20 a 25 °C).

5.1.2 Colección de ovocitos.

Los ovocitos se obtuvieron a partir de folículos de 2 a 8 mm de diámetro utilizando el método de aspiración con jeringa hipodérmica de 10 ml y aguja hipodérmica de calibre 18 (Becton, Dickinson and Company, México).

El líquido folicular obtenido de cada folículo aspirado se depositó en tubos cónicos de 50 ml (Sarstedt, Alemania) dejándose sedimentar durante 15 min. El botón resultante se depositó en una caja de petri (60 x 15mm) (Sarstedt, Alemania) y se realizó la búsqueda de los ovocitos bajo el microscopio estereoscópico (Olympus, 75x Japón), para evaluarlos morfológicamente dentro de una campana de flujo laminar (ESCO, Indonesia). Los ovocitos se seleccionaron para su cultivo, siguiendo los siguientes criterios:

1. Aspecto citoplasmático del oocito (Blondin y Sirard, 1995): debe poseer un citoplasma granulado fino y uniforme, sin mostrar espacio perivitelino ni vacuolizaciones (Brackett y Zuelke, 1993).

2. Aspecto y morfología del oocito y del cúmulo celular que lo rodea (De Loos, 1989).

OOCITO GRADO 1 o Calidad 1: Excelente. Los oocitos son esféricos y simétricos, de tamaño, estructura, color y textura uniforme, ovoplasma homogéneo. Están rodeados de tres a cinco capas completas de células del cúmulo (complejo cúmulo-corona completo) (De Loos, 1989).

OOCITO GRADO 2 o Calidad 2: Buena. Son oocitos esféricos y simétricos; de tamaño, color y textura uniforme, pero con pérdida parcial de las capas del cúmulo (complejo cúmulo-corona incompleto) (De Loos, 1989).

OOCITO GRADO 3 o Calidad 3: Regular. Los oocitos son esféricos y simétricos; de tamaño, color y estructura uniforme, pero solo con el recubrimiento de la corona radiada (De Loos, 1989).

OOCITO GRADO 4 o Calidad 4: Mala. El complejo células del cúmulo-ovocito está totalmente degenerado, o bien los ovocitos se encuentran totalmente desnudos (De Loos, 1989), es decir, que no presentan células del cúmulo. También pueden incluirse en esta clasificación como oocitos no viables a aquellos que presentan alteraciones dentro del citoplasma, tales como vacuolas o manchas oscuras.

OOCITO EXPANDIDO (llamado atrésico en algunos laboratorios). Es un oocito recién colectado, cuyas células del cúmulo se encuentran expandidas y muy separadas entre sí, su complejo cúmulo-ovocito se encuentra totalmente degenerado. Posiblemente proviene de un folículo maduro o de uno atrésico.

Las condiciones ambientales utilizadas durante la incubación fueron:

1. Mezcla gaseosa de 5 % de CO₂ y 95 % de aire, durante la maduración, la fertilización y el desarrollo embrionario.

2. La osmolaridad de los medios utilizados fue entre 270 y 290 mOsm (Gordon, 1994).

3. El pH de los medios dentro de la incubadora se mantuvo en el rango de 7.2 a 7.4, gracias a la concentración de 25 mM de NaHCO₃ en los medios y a la concentración de 5% de CO₂ en la atmósfera de cultivo (Gordon, 1994).

4. La temperatura a la que se se cultivaron fue de 38.5 °C (Gordon, 1994).

5.1.3 Maduración de los ovocitos.

Se utilizaron para la fase de maduración solamente aquellos ovocitos de calidad 1 a 3 de acuerdo a la clasificación de De Loos (1989). La maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos bovinos se hizo en forma aleatoria utilizando medio de maduración (TCM-199 Gibco-BRL, NY, USA), adicionado con 0.5µg/mL FSH (Pluset, Hertape-Calier, Brazil), 100 IU/mL HCG (Intervet, Holland), 1.0 µg/mL estradiol.además que fue suplementado con 10% de tres diferentes fuentes proteicas: suero fetal bovino (SFB), suero de vaca en estro (SVE), sustituto sintético de suero o (SR) (Serum Replacement, Gibco-BRL, NY, USA).

Las condiciones de cultivo a las que fueron sometidos los ovocitos en la incubadora fueron: 38.5 °C, 5% de CO₂ en 95% de aire y humedad a saturación,

conservando estas condiciones para la FIV y la División Embrionaria *in vitro* (DIV). Transcurrido el periodo de 22 a 24 h de maduración, los ovocitos se evaluaron en un microscopio estereoscópico, contabilizando la cantidad de ovocitos cuyas células del cúmulo mostraron expansión, para obtener así el porcentaje de ovocitos expandidos.

La evaluación de los ovocitos madurados se hizo según lo reportado por Alm *et al.*, (1998) en las siguientes categorías:

1. COC completamente expandido (células del cúmulo y de la corona radiada completamente expandidas, ZP claramente visible;
2. COC moderadamente expandido (células del cúmulo y de la corona radiada sueltas y la ZP no es claramente visible;
3. Mala expansión de las células (células del cúmulo parcialmente densas y picnóticas);
4. Sin expansión.

5.1.4 Fertilización *in vitro*.

La fertilización se realizó en microgotas de 90 μ l de medio de FIV (Medio Modificado Tyrode) suplementado con 3 mg/ml de BSA, fracción V, libre de ácidos grasos (SIGMA A8022), piruvato (SIGMA P4562) y 0.05g/ml de gentamicina (SIGMA G1264) , cubiertas con aceite mineral. Transcurrido el periodo de 22 a 24 h de maduración, los ovocitos se evaluaron en un microscopio estereoscópico. Se colocaron como máximo 25 ovocitos expandidos en cada gota conteniendo medio de fertilización. Los ovocitos fueron lavados en 2 gotas de 50 μ l medio FIV, y fueron transferidos a las cajas destinadas para la fertilización. Una vez depositados en las cajas de FIV (Corning, EUA) en gotas de 90 μ l de medio se llevó a cabo la descongelación del semen. Cada pajilla de semen de 0.5 ml se descongeló en baño maría a 35 °C por 30 seg y bajo el microscopio de contraste de fases (Olympus, Japón) se analizó el porcentaje de motilidad espermática post-descongelación. Entonces se lavó el semen por centrifugación en un tubo de 15 ml, con 2 ml de medio Tris Buffered Medium. El tubo se centrifugó a 751 xG por 5 min; terminada la centrifugación se desechó el sobrenadante y se añadieron 2 ml de medio FIV suplementado con 0.03 mg/ml de Penicilamina e Hipotaurina para estimular la motilidad así como 0.03 mg/ml de Heparina para inducir la capacitación espermática;

posteriormente se llevó a cabo una segunda centrifugación durante 5 min a 751 xG. Terminada esta centrifugación, el botón celular obtenido se resuspendió en 30 μ l medio de fertilización. Después se realizó el conteo espermático de la muestra de semen, por medio de un hemocitómetro, un microscopio óptico 400 x (Olympus, Japón) y un contador de células (VWR-36934-12), para determinar la concentración espermática de la muestra obtenida. A continuación se calcularon la concentración y el volumen requeridos para realizar la FIV en cada gota de 90 μ l de medio de fertilización.

Se agregaron 8 μ l de concentración final de espermatozoides diluidos en un volumen de 60 μ l en la que se encuentran aproximadamente 0.5×10^6 espermatozoides/ml. Los ovocitos y los espermatozoides se coincubaron durante un periodo de 18 a 24 h bajo las condiciones antes mencionadas.

5.2. Desarrollo embrionario *in vitro*.

Una vez transcurrido el período de fertilización, los ovocitos se lavaron tres veces en gotas de 50 μ l de SOF, removiendo la células cumulares de forma mecánica, mediante el pipeteo constante de los ovocitos de forma rápida tratando de eliminar la mayor parte de las mismas de esta manera, posteriormente se colocaron en gotas de 100 μ l de SOF cubierto con aceite mineral, en cajas de petri de 35 x10 mm.

Los cigotos fueron incubados en mismo suplemento utilizado durante la MIV (SFB, SVE, SR).

En cada gota se colocaron 25 probables cigotos en 100 μ l de medio de desarrollo, suplementado con aminoácidos esenciales y no esenciales y 0.1% de P/E (Thompson *et al.*, 1992). Los cigotos permanecieron en este medio durante 7 días, reemplazando la mitad del medio contenido en cada gota cada 48 h.

Una vez transcurridos los 7 días se llevó a cabo la evaluación embrionaria con un microscopio estereoscópico a 80 x (Olympus, Japón), para evaluar el grado de desarrollo con base en el número de divisiones que alcanzaron los embriones producidos, así como el porcentaje total de embriones que se desarrollaron hasta alcanzar las etapas de mórula y blastocisto de cada grupo racial y por suplemento proteico.

5.2.1. Criterios para la evaluación de los embriones.

Los embriones transferibles se separaron y se clasificaron de acuerdo a su desarrollo o estadio y a su calidad, de acuerdo a lineamientos internacionales (Dorn y Kraemer, 1987, IETS 1998). Los criterios que se tomaron en cuenta para la evaluación de los embriones son los siguientes:

Estado de desarrollo de acuerdo a la edad del embrión. Los embriones colectados deben tener un estadio de desarrollo relacionado con el día en que fueron fertilizados; es decir, si se colectaron el día 0, las estructuras que se deben observar son mórulas compactas, blastocistos jóvenes y blastocistos maduros.

Número de células. En los embriones muy jóvenes es importante contar sus blastómeros, ya que cuando tienen menos de 30 en el día 7, no son transferibles. Los transferibles son aquellos en los que la cuenta de blastómeros sea difícil, esto sin tomar en cuenta las características morfológicas del embrión.

Compactación de células. Debe observarse una compactación de blastómeros de forma poligonal ya que esto permite la nutrición entre blastómeros y contribuye a la formación del blastocele.

Color. Los embriones con excelente calidad son generalmente de color claro, los de buena calidad con un color más oscuro pero uniforme. Cuando hay manchas claras y oscuras esto es indicativo de problemas metabólicos. La presencia de vesículas puede ser normal, siempre y cuando no sean muy grandes y se encuentren en embriones con estadio de blastocisto temprano o maduro.

Blastómeros extruidos. Son células que quedaron en una etapa temprana de desarrollo y se observan como células grandes fuera de la masa celular (entre la ZP o el espacio perivitelino y la masa celular). A mayor cantidad de blastómeros extruidos, menor será la calidad del embrión.

Presencia de restos celulares en el espacio perivitelino. Esto indica que las membranas celulares se han roto, o que las células han degenerado. (Dorn y Kraemer, 1987, IETS 1998).

5.2.2. Evaluación morfológica de los embriones.

De acuerdo a la evaluación de su morfología, los embriones se clasificaron en cuatro grupos diferentes, dependiendo de la calidad de los mismos y de esta forma cada embrión

recibió un número del 1 al 4, que indica su calidad. La clasificación morfológica se describe a continuación:

Calidad 1 = Excelente. El embrión es compacto (la masa celular debe ser mayor al 85%), esférico, color claro, desarrollo adecuado a su edad, pocas vesículas, sin desechos celulares ni blastómeros extruidos.

Calidad 2 = Bueno. El embrión es compacto o con una leve descompactación (por lo menos el 50% de las células deben estar intactas), poco irregular, color uniforme, desarrollo adecuado a su edad, presencia de pocas vesículas y blastómeros extruidos, pocos desechos celulares.

Calidad 3 = Regular. Tienen una descompactación muy marcada (por lo menos el 25% de las células deben estar intactas), desechos celulares, color oscuro o con zonas claras y oscuras, vesículas, blastómeros extruidos y masa pequeña.

Calidad 4 = Malo o No Transferible. El embrión tiene una degeneración muy marcada, masa pequeña (menor al 25% de lo normal), color oscuro, descompactación, vesículas, irregularidades en los blastómeros.

5.2.3. Evaluación embrionaria.

La clasificación de la etapa o estadio de desarrollo embrionario se determinó con el microscopio estereoscópico. Cada embrión recibió un número del 1 al 8, de acuerdo a su desarrollo individual, como se describe a continuación:

- 1 = Ovulo;
- 2 = Embrión de 2 a 16 células;
- 3 = Mórula temprana;
- 4 = Mórula compacta;
- 5 = Blastocisto temprano;
- 6 = Blastocisto maduro;
- 7 = Blastocisto expandido; y
- 8 = Blastocisto eclosionado. (Dorn y Kraemer, 1987, IETS 1998).

5.3. Análisis Morfológico.

Para detectar la presencia de los lípidos saturados e insaturados así como para conocer la calidad de los embriones y ovocitos producidos con los 3 diferentes

tratamientos y grupos raciales, se utilizaron las técnicas de fijación para microscopía de campo claro.

5.3.1. Microscopía Electrónica.

Una vez clasificados los embriones de acuerdo a su calidad, fueron procesados para Microscopía Electrónica de Transmisión (ME), procediendo a la fijación por inmersión en fijador de Karnovsky modificado a un pH de 7.4, con 2.5% de Glutaraldehído y 1% de Paraformaldehído (Karnovsky, 1965) manteniéndolos durante 60 min; posteriormente fueron lavados en solución amortiguadora a base de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4, transportándolos al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Posteriormente se llevó a cabo la post fijación con tetraóxido de osmio al 1 % durante 1.0 h. Después se realizó la deshidratación de las muestras en alcohol etílico a través en una serie de concentraciones ascendentes (70, 80, 90, 95 y 100%), permaneciendo por un lapso de 20 min en cada una, realizándose finalmente la infiltración en EPON 812 (Pelco Internacional, México), comenzando por colocar las muestras en acetonitrilo, con dos cambios de 20 min y después en diluciones de resina 1:1 (acetonitrilo en relación a EPON) y 2:1 cada una con un tiempo de 1.0 h, y después en EPON 812 puro donde permanecieron por 24 h a temperatura ambiente. Finalmente las muestras se incluyeron en EPON 812 en moldes y se polarizaron en una estufa a 60 °C durante 24 h.

Una vez terminado el proceso, se realizaron cortes semifinos (1 μm) de los ovocitos y embriones en el ultra micrótopo LKB (Leica, Australia) los cuales fueron teñidos con azul de Toluidina al 0.5% analizándose al microscopio de luz con la finalidad de determinar el grosor en el cual se deben de realizar los cortes finos. Posteriormente, se obtuvieron cortes finos (50-70 nm), contrastándolos con acetato de uranilo y citrato de plomo, los cuales fueron montados en rejillas de cobre de 100 mesh para su revisión ultraestructural en el ME (Jeol, Japón).

5.3.2. Análisis de imágenes.

Se realizó la cuantificación de la presencia de gotas lipídicas presentes en el citoplasma de los embriones y ovocitos, utilizando como referencia la tonalidad presente en las imágenes por efecto del Tetraóxido de Osmio (OsO_4) que reacciona con las gotas lipídicas citoplásmicas dependiendo de su nivel de saturación. Cuando se trata de lípidos

saturados, la reacción reductora del OsO₄ es limitada o nula, quedando un espacio vacío donde se encontraba la gota lipídica; en este caso se observa un espacio de color blanco. La explicación es que al no reaccionar con el OsO₄, los lípidos saturados son extraídos durante la deshidratación con etanol. En contraste, las gotas cuyo contenido es de lípidos no saturados, reaccionan y reducen el OsO₄ formando un precipitado que reacciona con el azul de toluidina y da un color verde al microscopio de luz. Al ME, estas gotas son electrodensas, en tanto que las gotas lipídicas saturadas aparecen como cavidades (Bozzola y Russell, 1999).

Cada laminilla fue analizada mediante la observación en un microscopio de luz marca Zeiss AxioCOP, equipado con una cámara AxioCamHRc (Zeiss, Alemania); las fotomicrografías fueron almacenadas con el Programa AxioVision v. 4.7.2.

Las imágenes digitalizadas, una de cada muestra se utilizaron para la cuantificación de las gotas lipídicas, capturando uno o dos campos por imagen mediante la utilización de las herramientas de análisis de imágenes del programa ImageJ (versión 1.46b, Wayne Rasband, NIH, USA).

5.4 Análisis estadístico.

El diseño experimental fue un factorial de 3 x 3 con seis replicas donde los factores a evaluar fueron: 1) Tres grupos raciales y 2) Tres suplementos proteicos. Los datos correspondientes al desarrollo embrionario fueron analizados mediante un Análisis de Varianza (SAS, 1998). Para comparar las diferencias entre medias, se utilizó una prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Todos los análisis fueron realizados mediante el programa SAS (SAS, 1998).

Para evaluar la presencia de lípidos intracitoplasmáticos en los ovocitos y embriones, así como las diferencias entre los grupos raciales de los embriones producidos *Bos indicus*, *Bos taurus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* en cada uno de los medios suplementados con pruebas no paramétricas (Kruskal Wallis), con un nivel de significancia estadística $p < 0.05$, empleando el programa Statistica 5.0 versión 5 (Stats Soft, Reino Unido, 1997).

VI. RESULTADOS.

6.1. Ovocitos madurados y fertilizados.

Las proporciones de ovocitos madurados y fertilizados del presente trabajo no mostraron diferencias entre los tres suplementos (Cuadro 2). Durante el desarrollo *in vitro*, se observó una mayor producción de embriones en aquellos provenientes de los cultivos con SFB en comparación con la cantidad obtenida de SVE y SR.

Cuadro 2. Ovocitos de bovino madurados y fertilizados *in vitro* y embriones divididos después de la adición de tres tipos de suplementos proteicos.

Tipo de suero	MIV	FIV	DIV
SFB	94.7 ^a (1225/1294)	98.9 ^a (1211/1225)	91.5 ^a (1108/1211)
SVE	93.2 ^a (1215/1303)	99.1 ^a (1204/1215)	85.1 ^b (1024/1204)
SR	93.5 ^a (1238/1324)	98.0 ^a (1213/1238)	87.7 ^b (1063/1213)

SFB: Suero Fetal Bovino. SVE: Suero de Vaca en Estro. SR: Serum Replacement.

MIV: Maduración *in vitro*. FIV: Fertilización *in vitro*. DIV: Desarrollo embrionario *in vitro*.

a, b y c, literales distintas en la misma columna representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

6.1.2. Embriones producidos con tres diferentes suplementos proteicos.

Del total de embriones producidos en los tres tratamientos (1462), el número de embriones obtenidos con cada suplemento fue diferente (Cuadro 3), observándose un mayor porcentaje de embriones obtenidos de los cultivos suplementados con SFB y SVE comparados con la cantidad obtenida del SR.

Cuadro 3. Embriones bovinos producidos a partir de embriones que se dividieron, en medio Fluido Sintético de Oviducto (SOF) adicionado con tres suplementos proteicos.

Tipo de Suero	Embriones (%/n)	Mórulas (%/n)	Blastocistos (%/n)		
			Iniciales	Compactos	Expandidos
SFB	51.7 ^a (573/1108)	14.7 ^a (84/573)	24.1 ^a (138/573)	25.2 ^a (207/573)	36.1 ^a (207/573)
SVE	51.7 ^a (529/1024)	12.3 ^b (65/529)	29.5 ^b (156/529)	30.0 ^b (150/529)	28.4 ^b (150/529)
SR	33.8 ^b (360/1063)	18.1 ^c (65/360)	31.4 ^b (113/360)	28.3 ^c (80/360)	22.2 ^c (80/360)

a, b y c, literales distintas en la misma columna representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$). SFB: Suero Fetal Bovino. SVE: Suero de Vaca en Estro. SR: Serum Replacement.

Los mayores porcentajes de embriones correspondieron a los producidos con suplemento SFB y SVE, siendo diferentes a aquellos producidos con SR ($p < 0.05$). La

cantidad de embriones producidos fue diferente para cada tratamiento. Se obtuvo un mayor porcentaje de mórulas a partir de los ovocitos suplementados con SR, seguido por aquellos cultivados con SFB y siendo menor el del grupo de SVE ($p < 0.05$). Esta cantidad fue diferente en lo que respecta a producción de blastocistos. El mayor porcentaje de embriones expandidos se presentó en el grupo SFB, seguida por los del grupo de SVE y los porcentajes menores fueron los del tratamiento SR ($p < 0.05$). En el Cuadro 4 se puede observar la proporción de cigotos divididos *in vitro* (DIV).

Cuadro 4. Ovocitos de tres tipos raciales bovinos madurados y fertilizados *in vitro*, y la resultante división embrionaria *in vitro*.

Tipo racial	Porcentaje de ovocitos		
	MIV (%/n)	FIV (%/n)	DIV (%/n)
B. taurus	92.3 ^a (1055/1143)	96.7 ^a (1020/1055)	85.20 ^a (869/1020)
B. indicus	95.0 ^b (1283/1351)	99.5 ^b (1277/1283)	92.40 ^b (1180/1277)
B.t x B.i	93.9 ^a (1340/1427)	99.3 ^b (1331/1340)	86.10 ^a (1146/1331)

SFB: Suero Fetal Bovino. SVE: Suero de Vaca en Estro. SR Serum Replacement.

MIV: Maduración *in vitro*. FIV: Fertilización *in vitro*. DIV: Desarrollo embrionario *in vitro*.

a, b y c, literales distintas en la misma columna representan diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

6.1.3. Porcentaje de embriones producidos a partir de los tres tipos raciales.

Los tres grupos raciales tuvieron diferencias en la proporción de embriones. El mayor porcentaje de embriones producidos correspondió a *Bos indicus*, seguido de *Bos indicus x Bos taurus* y después de *Bos taurus* ($p < 0.05$. Cuadro 5). Así mismo se obtuvieron diferencias entre el estadio embrionario de cada grupo racial, para los embriones producidos en el caso de las mórulas, en los tres grupos raciales hubo diferencia, obteniéndose un mayor porcentaje en los embriones producidos a partir de vacas *Bos indicus* y el menor porcentaje fue de las vacas *Bos taurus*. Para los blastocistos, hubo diferencias entre el grado de desarrollo de los mismos, en el caso de los blastocistos iniciales, hubo un mayor porcentaje de producción de las vacas *Bos taurus x Bos indicus*, comparado con los otros dos grupos raciales. En los blastocistos compactos hubo mayor porcentaje para los producidos de los grupos *Bos indicus* y la cruce de *Bos indicus x Bos taurus*, que los producidos de vacas *Bos taurus*. En el caso de los blastocistos expandidos el mayor porcentaje fue a partir de vacas *Bos taurus* habiendo diferencias estadísticamente significativas con aquellos producidos de *Bos indicus* y *Bos indicus x Bos taurus* que fueron menores.

Cuadro 5. Embriones de tres tipos raciales de bovino cultivados en Fluido Sintético de Oviducto durante 7 días.

Tipo racial	Embriones (%/n)	Mórulas (%/n)	Blastocistos (%/n)		
			Inicial	Compacto	Expandido
B. taurus	34.1 ^a (299/869)	15.1 ^a (45/299)	23.4 ^a (70/299)	22.7 ^b (68/299)	38.8 ^a (116/299)
B. indicus	50.8 ^b (599/1180)	16.5 ^b (99/599)	28.3 ^b (170/599)	29.1 ^a (174/599)	26.1 ^b (156/599)
B.t x B.i	42.2 ^c (564/1146)	12.4 ^c (70/564)	31.4 ^c (167/564)	28.7 ^a (162/564)	29.2 ^b (165/564)

B. taurus: *Bos taurus*, *B. indicus*: *Bos indicus*, *B.t x B.i.*: *Bos taurus x Bos indicus*

6.2. Evaluación de los ovocitos madurados *in vitro* por microscopía electrónica de transmisión.

En la Figura 1 se observa un ovocito con las microvellosidades citoplásmicas y gránulos corticales en la superficie. Las gotas lipídicas son de diferentes diámetros y densidad variable. Por ME, las gotas o inclusiones lipídicas son de dos tipos: gotas grandes con contenido moderadamente electrodenso y relativamente pequeñas con nula electrodensidad y algunas partículas en su interior (Figuras 1A, B y D). Ambos tipos de gotas lipídicas pueden distinguirse de vesículas y vacuolas citoplásmicas por carecer de membrana plasmática en su superficie. Sin embargo, muchas de las gotas pequeñas y algunas de las grandes, aparecen rodeadas por cisternas de retículo endoplásmico liso (Figuras 1C y D). Las mitocondrias se encuentran en paquetes complejos asociadas con gotas lipídicas del tipo pequeño y otros organelos citoplásmicos (complejo de Golgi, retículo endoplásmico, vacuolas y lisosomas) (Figuras 1A y 2A). Los paquetes son irregulares en tamaño y distribución sin clara distinción cualitativa entre las tres razas y medios de incubación. Una vez establecidas sus características estructurales y distribución al microscopio electrónico, las gotas lipídicas fueron identificadas y cuantificadas con microscopía óptica de alta resolución en cortes semifinos teñidos con azul de toluidina. Ejemplos ilustrativos de las tres razas analizadas en medios de incubación con diversos suplementos se muestran en las Figuras 1B, 2B y 3.

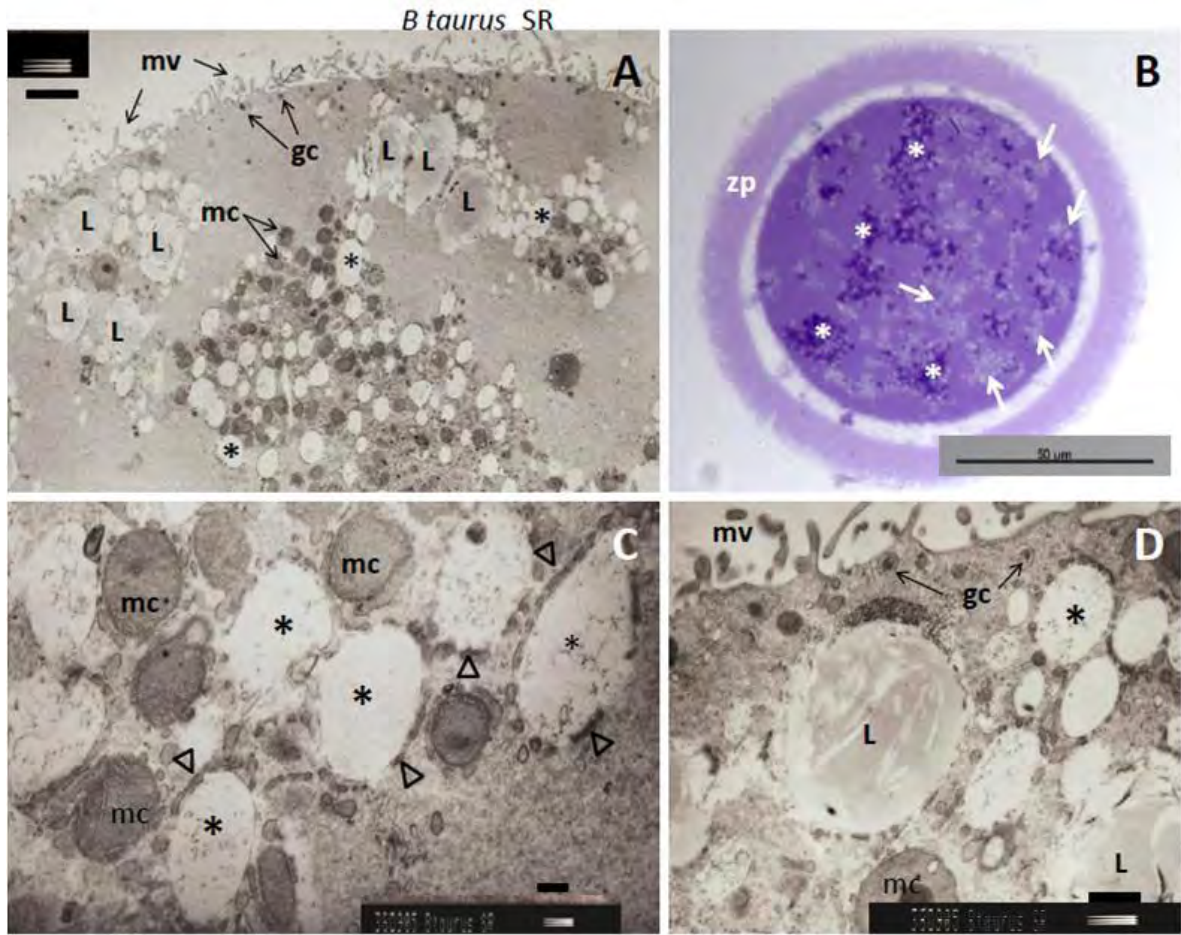


Figura 1. Micrografías obtenidas por microscopía de luz y electrónicas de un ovocito de *Bos taurus* madurado en medio con Serum Replacement (SR) **A.** Micrografía electrónica mostrando parte del citoplasma cortical con microvellosidades (mv), gránulos corticales (gc), grandes gotas lipídicas (L) pequeñas gotas de lípidos (*). **B.** Imagen de un corte semifino teñido con azul de toluidina del mismo ovocito mostrado en la imagen A. Las flechas blancas señalan grupos de gotas lipídicas grandes. Paquetes de organelos con mitocondrias y gotas pequeñas de lípidos (*) aparecen distribuidos al azar en el citoplasma del ovocito. La zona pelúcida (zp) aparece intacta. **C** y **D.** Muestran micrografías electrónicas de mayor resolución correspondientes al ovocito de la imagen A. La mitocondrias con crestas escasas (mc) y cisternas de retículo endoplásmico (cabezas de flecha) en torno a gotas lipídicas (*) son evidentes. En la superficie del citoplasma pueden apreciarse microvellosidades (mv) y gránulos corticales (gc). Barras: A, C y D= 1 μ m, B= 50 μ m

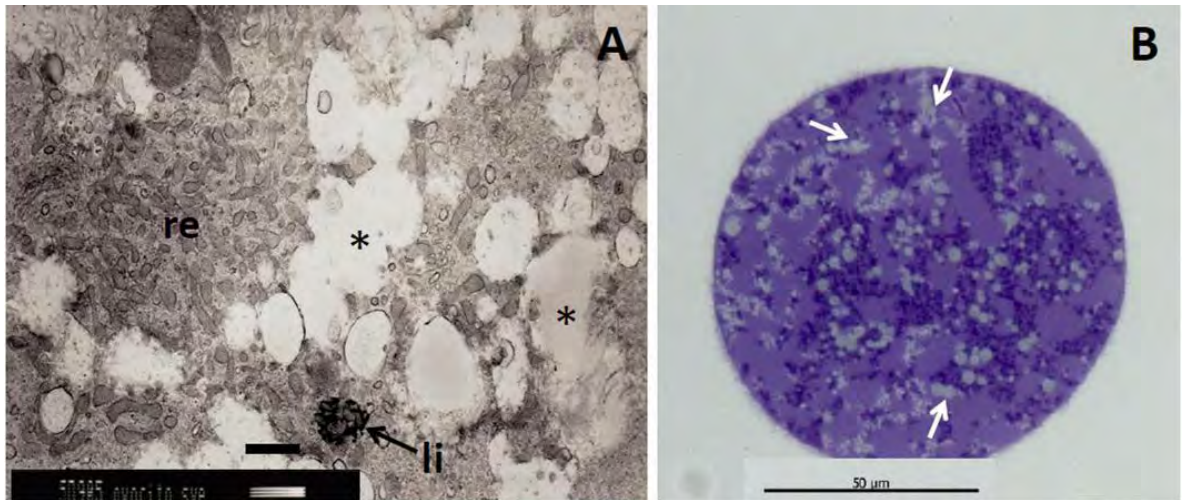


Figura 2 Ovocito de *Bos indicus* incubado en medio complementado con SVE. **A.** Micrografía electrónica mostrando parte de un paquete de organelos con abundantes cisternas de retículo endoplásmico (re), mitocondrias (mc), lisosomas (li) y gotas lipídicas. Con frecuencia estas últimas coalescen formando gotas de mayor diámetro (*). **B.** Corte semifino teñido con azul de toluidina mostrando abundantes gotas lipídicas en tono verdoso (flechas). Barras: A=1 μ m, B= 50 μ m

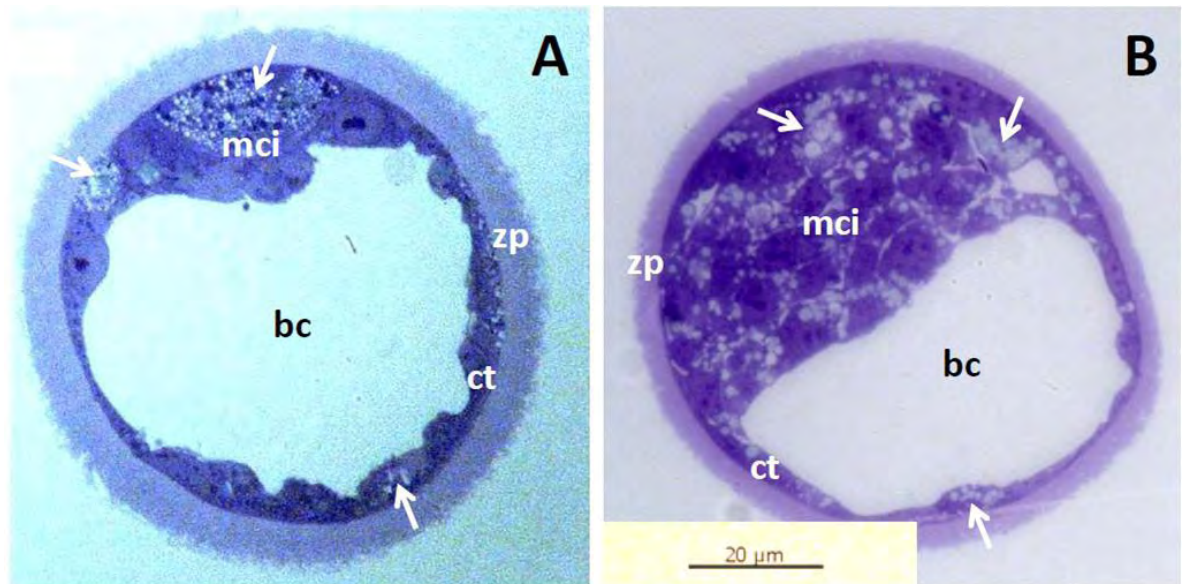


Figura 3. Cortes semifinos teñidos con azul de toluidina de blastocistos de bovino diferenciados con diferentes complementos proteicos. **A.** *Bos indicus* desarrollado en medio suplementado con SR. **B.** Blastocisto derivado de la cruce *Bos taurus* con *Bos indicus* incubado en suero fetal bovino (SFB). Las flechas blancas indican agrupamientos de gotas lipídicas. Zona pelúcida (zp), masa celular interna (mci), blastocele (bc), trofoblasto mural (ct).

6.2.1. Cuantificación de lípidos.

Se sometieron un total de 143 ovocitos y embriones a cuantificación de lípidos, de los cuales 67 fueron ovocitos y 76 embriones, lo que correspondió a un 43 y un 57% respectivamente. (Cuadro 6).

Cuadro 6. Gotas de lípidos en ovocitos y embriones de bovino producidos *in vitro* en tres diferentes suplementos proteicos.

Suplemento (Número de Estructuras)	Gotas de Lípidos en Ovocitos	Gotas de Lípidos en Embriones
SFB (n=58)	367 ± 311 ^a	74 ± 71 ^a
SVE (n=39)	243 ± 166 ^b	21 ± 15 ^b
SR (n=46)	214 ± 132 ^c	83 ± 71 ^a

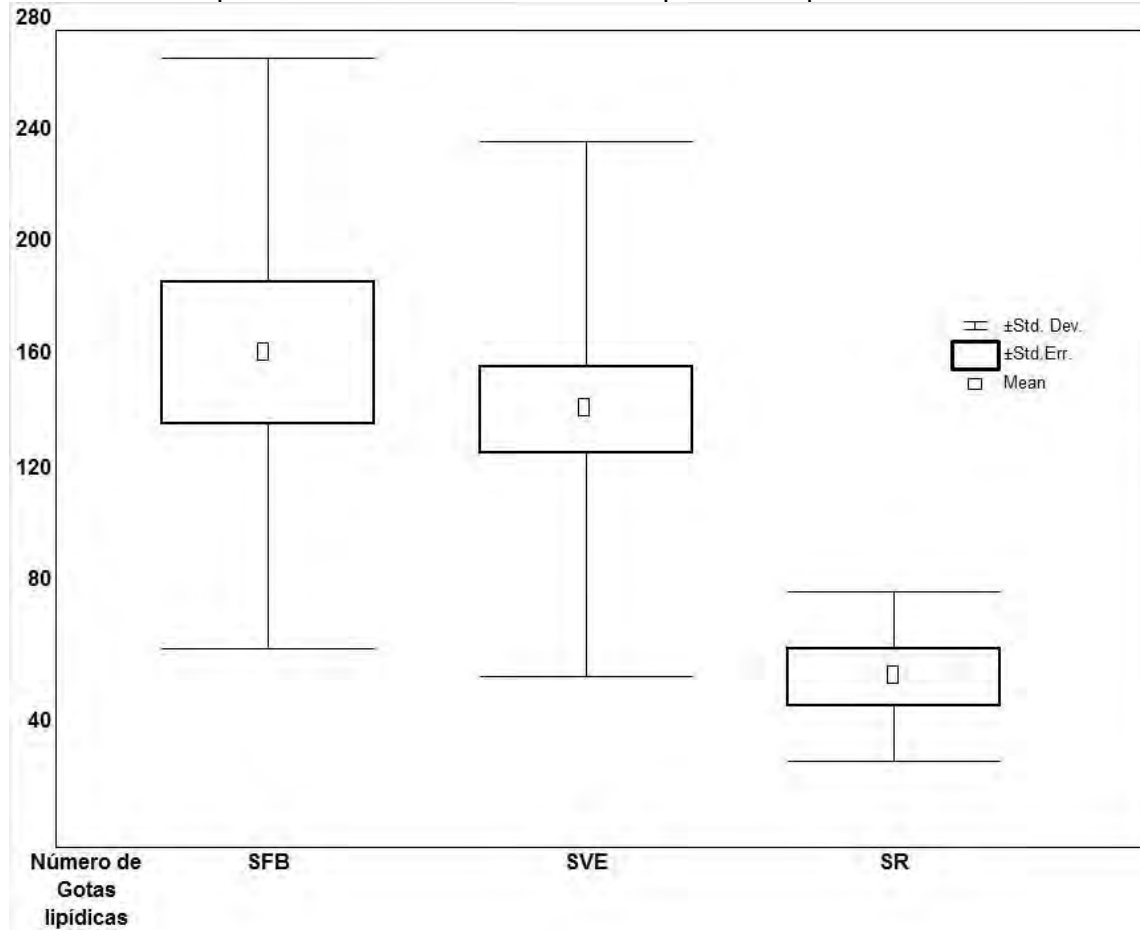
SFB: Suero Fetal Bovino. SVE: Suero de Vaca en Estro. SR: Serum Replacement.

Los valores son promedios ± Desviación Estándar DE. Valores con letras diferentes en columnas difieren significativamente ($p < 0.05$).

Los ovocitos cultivados en SFB presentaron un mayor número de gotas lipídicas que los cultivados en SR y SVE ($p < 0.05$). El menor número de gotas lipídicas en embriones correspondió a los cultivados con suplemento SVE, la diferencia del número de gotas de lípidos con respecto a los dos suplementos restantes fue significativa ($p < 0.05$).

Se analizó de igual forma el efecto de los diferentes tipos de suplementos proteicos, sin importar la estructura biológica, observándose que la menor acumulación de lípidos se registró en aquellos embriones suplementados con SR, como se muestra en la Figura 4.

Figura 4. Número de gotas lipídicas intracitoplasmáticas en ovocitos y embriones de bovino de tres tipos raciales cultivados con tres suplementos proteinicos.



El menor promedio del total de gotas lipídicas intracitoplasmáticas de ovocitos lo mostraron las estructuras celulares procedentes del genotipo *Bos indicus*, siguiendo aquellos ovocitos del grupo *Bos indicus* x *Bos taurus* observándose mayor acumulación lipídica de aquellos ovocitos obtenidos de vacas *Bos taurus*. Con respecto a la acumulación de lípidos en los embriones cultivados, de igual forma se observó menor acumulación en aquellos procedentes de vacas *Bos indicus*, diferencias que fueron significativas ($p < 0.05$). Por el contrario, el mayor promedio de lípidos se registró en las

estructuras cultivadas procedentes de *Bi* x *Bt*, con diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a los promedios de los lípidos de las estructuras cultivadas de los otros dos genotipos. No fue posible obtener muestra de embriones del grupo *Bt* (Cuadro 7).

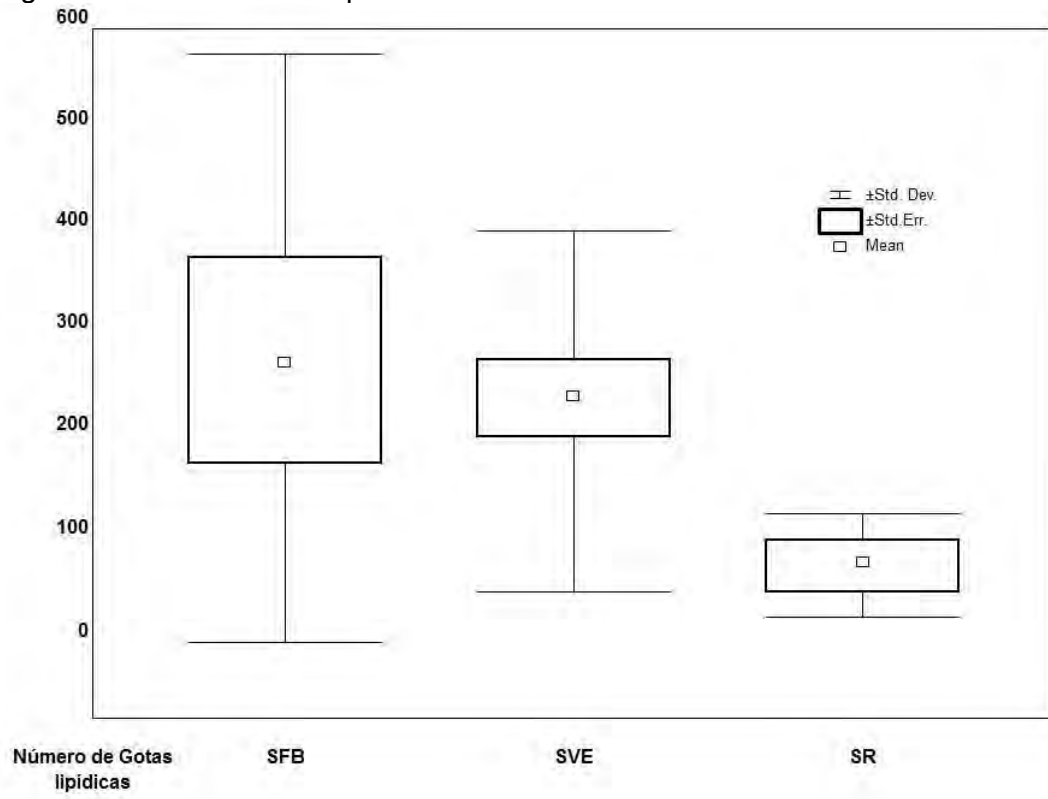
Cuadro 7. Gotas de lípidos en las estructuras biológicas de tres grupos raciales de ovocitos bovinos madurados *in vitro*.

Grupo Racial	Gotas de Lípidos en Ovocitos	Gotas de Lípidos en Embriones
<i>Bos Taurus</i>	318±247 ^a (n= 21)	- (n= 0)
<i>Bos indicus</i>	229±211 ^c (n= 25)	65±68 ^b (n= 71)
<i>Bos indicus</i> x <i>Bos Taurus</i>	243±166 ^b (n= 25)	85±74 ^a (n= 29)

Los valores son promedios ± Desviación Estándar. Valores con letras diferentes en columnas difieren significativamente ($p < 0.05$).

Al analizar los datos separando el grupo racial y suplemento utilizado para el caso del grupo racial de origen Cebú, se presentó una tendencia de mayor acumulación de gotas lipídicas en aquellos ovocitos suplementados con SFB, como se muestra en la Figura 5.

Figura 5. Cantidad de lípidos totales en ovocitos *Bos indicus* madurados *in vitro*.



VII. DISCUSIÓN.

El papel del SFB en la maduración y el posterior desarrollo *in vitro* de ovocitos de diferentes especies de mamíferos no ha sido completamente dilucidado, a pesar del amplio uso de este suplemento para la producción de embriones *in vitro*. Su composición hasta cierto punto es desconocida, la variabilidad en la misma como reflejo de la diversidad en su origen y los problemas derivados de su uso, tanto en ovocitos y embriones como en las crías resultantes han hecho que sea imprescindible el estudio detallado de su efecto sobre las diferentes estructuras celulares y sobre los diferentes aspectos que afectan la viabilidad y el éxito del desarrollo embrionario. Aunado a ello, la variabilidad que agrega a los sistemas de cultivo limita su uso en trabajos experimentales. Por lo anterior, la búsqueda de compuestos definidos que puedan sustituir el uso de SFB con resultados similares se ha convertido en una necesidad imperiosa.

En el presente estudio se utilizaron 3 diferentes fuentes de proteínas (SFB, SVE, SR) durante el proceso de MIV y CIV, con la finalidad de identificar aquel suplemento que proporcionara a los embriones las mejores condiciones de cultivo, lo que se reflejaría en el número de embriones viables producidos y en menor acumulación de lípidos.

Durante la maduración y fertilización *in vitro*, no existieron diferencias entre los 3 suplementos, de forma tal que el porcentaje de ovocitos madurados y fertilizados fue similar. Estos resultados coinciden con los de varios autores (Duque *et al.*, 2003; Mucci *et al.*, 2006; More *et al.*, 2007) quienes demostraron que es posible llevar a cabo la maduración y fertilización *in vitro* con fuentes proteicas diferentes al SFB y con resultados similares. Así mismo, coincide con los resultados de Sagirkaya *et al.* (2007), quienes no encontraron diferencias significativas en las etapas de MIV y FIV en su trabajo, al investigar la posibilidad de utilizar SR en lugar de SFB a niveles del 10%, durante la maduración y la fertilización de ovocitos bovinos. También es coincidente con la ausencia de diferencias de la MIV y FIV reportadas por Chauhan *et al.*, (1998), al evaluar la maduración en la fertilización *in vitro* de ovocitos de búfalo y el posterior desarrollo del embrión en medio TCM-199 suplementado con 10% de SFB, o suero de búfala en estro, o suero de búfala superovulada.

Sin embargo, durante el cultivo embrionario existieron diferencias en la producción de embriones dependiendo de la raza de origen de los ovarios, mostrando mejores porcentajes aquellos ovocitos procedentes de vacas *Bos taurus* x *Bos indicus*. Estos

resultados podrían atribuirse a las condiciones de adaptabilidad de los diferentes grupos raciales al medio ambiente, pero se recomienda llevar a cabo más estudios bajo condiciones controladas.

En la división embrionaria, los resultados fueron similares entre la utilización del SFB, SVE y SR, lo que demuestra que es posible emplear de manera exitosa un suero sintético ya que éste produce resultados similares en cuanto al número de embriones producidos en día 7 a los obtenidos con SFB. Si se toma en cuenta que los sistemas tradicionales de cultivo incluyen la suplementación con sustancias proteicas y que en muchos de los casos no se conoce a fondo el contenido de las mismas, al no ser estos medios químicamente definidos, el desarrollo de un embrión durante el periodo posterior a la implantación puede estar afectado por las condiciones en las que fue cultivado, siendo estas probablemente las responsables del mayor volumen y peso fetal de los becerros obtenidos tras la transferencia de embriones producidos *in vitro* (Kruip y Den Daas 1997). En este sentido, se ha comprobado que la presencia de SFB en el medio de cultivo es uno de los factores que más influyen en el incremento del peso al nacimiento (Thompson *et al.*, 1995). Otro hecho que condiciona la presencia de suero en el medio de cultivo es la resistencia de los embriones a la criopreservación, ya que los embriones cultivados en un medio libre de suero sobreviven en mayor medida a los efectos del choque por frío (Shamsuddin *et al.*, 1994; Massip *et al.*, 1995). El suero es considerado un compuesto variable e indefinido (Gardner y Lane 1998), lo cual genera variaciones en la composición de los medios utilizados e interfiere con la reproducibilidad de los resultados obtenidos. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que es posible llevar a cabo la suplementación del medio, en particular SOF, con un sustituto de suero sin embargo se reduce el número de embriones producidos comparando con los resultados cuando se adiciona SFB al medio de desarrollo, reduciendo los efectos adversos que son atribuidos al SFB y que previamente han sido mencionados, como: excesiva producción de lactato; presencia de células oscuras y granuladas en la MCI (Bavister *et al.*, 1992, Krisher *et al.*, 1999); aumento de células apoptóticas (Byrne *et al.*, 1999); menor síntesis proteica (Kuran *et al.*, 2001) y disminución de la relación células de la MCI: células trofoblásticas y del número de complejos de unión entre las células embrionarias (Shamsuddin y Rodríguez-Martínez 1994); y la acumulación anormal de gotas lipídicas intracitoplasmáticas (Abe *et al.*, 1999a,b; Dorland *et al.*, 1994; Shamsuddin y Rodríguez-Martínez 1994; Thompson *et al.*, 1995). Es importante mencionar que en los resultados de la evaluación embrionaria al día

7, se observó que existieron variaciones entre las razas estudiadas y el tipo de suplemento utilizado. Tal es el caso de la producción de embriones de *Bos taurus*: en mórulas, Blastocistos, Blastocistos expandidos se obtuvieron mejores respuestas en el medio suplementado con SR. Sin embargo, en los blastocistos los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó SFB como suplemento, lo cual coincide con lo reportado por Pinyopummintr y Bavister (1994) y Thompson *et al.*, (1998), quienes observaron que la adición de suero fetal a los medios de cultivo estimula el desarrollo de los blastocistos, así como la eclosión.

En los embriones provenientes de vacas *Bos indicus*, los estadios de mórula, Blastocistos expandidos y Blastocistos, se comportaron de igual forma con la suplementación de SR, presentando los mejores resultados de producción. Sin embargo, en los Blastocistos expandidos hubo mayor producción que en aquellos suplementados con SFB.

Se ha llevado a cabo la cuantificación de lípidos en ovocitos y embriones a través de métodos cuantitativos como la cromatografía de gas, sin embargo este tipo de metodología, requiere de equipos especiales y costosos además de muestras de alrededor de 1000 células (ovocitos o embriones); también se han cuantificado los lípidos mediante ensayos enzimáticos de microfluorescencia, que aunque su utilización es más accesible, de igual forma se necesitan alrededor de 100 ovocitos o embriones para poder llevarse a cabo (Barceló-Fimbres y Seidel, 2011).

Es por esta razón que en el presente este trabajo se decidió utilizar las muestras obtenidas para microscopía de luz, evaluando los efectos obtenidos por las deshidrataciones del alcohol, en las cuales es posible observar los lípidos cuando quedan dentro de la gota, y aquellos que son extraídos por acción de los alcoholes.

Se ha informado que el SR utilizado para este trabajo se encuentra totalmente libre de factores de crecimiento, citoquinas, hormonas, inmunoglobulinas y otras macromoléculas, por lo cual se asegura que los resultados pueden ser repetibles (More *et al.*, 2007). Por otra parte, El SFB es utilizado en la producción de embriones *in vitro* de forma rutinaria, sin embargo, existen informes que indican que es la causa de las alteraciones observadas en los embriones producidos con suero fetal (Sudano *et al.*, 2011).

La razón por la cual se acumulan lípidos en el citoplasma aun es desconocida, sin embargo se cree que pueden ser resultado de dos procesos: primero, que el embrión es

capaz de absorber los lípidos del ambiente de cultivo, especialmente en los casos donde existe una buena fuente de lípidos, que podría ser el suero. Segundo, se postula que esta acumulación de lípidos es resultado de la falta de capacidad mitocondrial para metabolizar los complejos lipídicos a través de beta oxidación. En cualquiera de los casos, los lípidos representan un factor negativo para la sobrevivencia de los embriones, ya que estos son más susceptibles a los daños oxidativos así como presentan una baja tolerancia a los procesos de criopreservación (De la Torre-Sánchez, 2006).

La acumulación de lípidos en ovocitos madurados y fertilizados en el presente trabajo mostraron diferencias entre los tres suplementos, siendo los ovocitos suplementados con SR los que obtuvieron la menor cantidad de gotas lipídicas, lo que coincide con lo reportado por Sudano *et al.* (2011), quien al eliminar la utilización de suero en el día 4, observó una disminución del contenido de lípidos en los embriones producidos observando también una mejora en la calidad de los embriones producidos. Diversos autores (Abe *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2001, 2002; Yamashita *et al.*, 1999) demostraron que se obtienen mejores porcentajes de sobrevida poscriopreservación en embriones producidos en medios suplementados con BSA y libres de suero, independientemente del sistema de criopreservación empleado. Finalmente una mejora en la calidad de los embriones producidos permitiría obtener mejores porcentajes de gestación, principalmente por la transferencia de embriones criopreservados, posibilitando la aplicación comercial en gran escala de esta biotecnología.

Es importante mencionar que este trabajo presenta resultados que favorecen la producción de embriones de razas *Bos indicus* y su cruce con *Bos taurus*, comparados con los resultados de las vacas *Bos taurus*, estos resultados podrían atribuirse a la adaptación de dichos animales al trópico, ya que si bien el procedimiento es realizado *in vitro*, los ovocitos son obtenidos *in vivo* y manipulados durante diversos procedimientos.

VIII. CONCLUSIONES.

Con los resultados obtenidos puede concluirse que es posible suplementar el medio SOF con un sustituto sintético de suero que permite obtener resultados que aunque son menores a los que se tienen cuando se adiciona SFB al medio de desarrollo, permite producir embriones con menor acumulación de gotas lipídicas intracitoplasmáticas en los embriones cultivados *in vitro*.

La menor cantidad de lípidos significa una mejora en la calidad de los embriones producidos *in vitro*, lo que sugiere la necesidad de llevar a cabo más estudios para criopreservar los embriones producidos con SR y posteriormente evaluar si al ser descongelados y transferirse son capaces de producir mejores porcentajes de gestación a fin de contribuir a la aplicación comercial y en gran escala de esta biotecnología.

Este estudio demuestra que es posible llevar a cabo una cuantificación relativa de lípidos con las muestras obtenidas utilizando como referencia la tonalidad presente en las imágenes por efecto del Tetraóxido de Osmio OsO_4 que reacciona con las gotas lipídicas citoplásmicas dependiendo de su nivel de saturación para microscopía de luz, evaluando los efectos obtenidos por las deshidrataciones del alcohol, en las cuales es posible observar los lípidos cuando quedan dentro de la gota, y aquellos que son extraídos por acción de los alcoholes, lo que brinda una nueva opción para analizar dichas estructuras en embriones y ovocitos bovinos y apartir de estos datos es posible inferir las diferencias en la acumulación de lípidos.

Esta técnica puede ser utilizada como modelo para la cuantificación de lípidos en embriones y ovocitos de otras especies de animales domésticos.

IX. PERSPECTIVAS

Para siguientes trabajos sería recomendable utilizar una tinción específica para cuantificación de lípidos, como Sudán Black o Rojo de Nilo.

Para tener mayor conocimiento de los suplementos utilizados sería recomendable realizar el análisis de lípidos de cada uno de ellos para así conocer su composición.

Sería importante también contar con un control de embriones producidos de forma convencional.

Se propone evaluar la criotolerancia de embriones producidos con los diferentes suplementos.

X. REFERENCIAS.

1. Abe H, Yamashita T, Itoh T, Satoh T, Hoshi H. 1999a. Histochemical and ultrastructural evaluations of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing media. *Theriogenology*. 51, 232.
2. Abe H, Yamashita T, Itoh T, Satoh T, Hoshi H. 1999b. 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. *Molecular Reproduction Development*; 53, 325-335.
3. Abe H, Yamashita T, Satoh T, Hoshi H. 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Molecular Reproduction Development*; 61: 57-66.
4. Abe H, Hoshi H. 2003. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. *Journal of Reproduction and Development* 49, 193–202.
5. Abeygunawardena H, Dematawewa CM. 2004. Pre-pubertal and postpartum anestrus in tropical Zebu cattle. *Animal Reproduction Science*. 82-83:373-387.
6. Adamiak SJ, Powell K, Rooke JA, Webb R, Sinclair KD. 2006. Body composition, dietary carbohydrates and fatty acids determine post-fertilisation development of bovine oocytes *in vitro*. *Reproduction* 131: 247-258.
7. Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP. 1992. Association between surges of folliclestimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal Reproduction and Fertility*. V 94, no. 1. Pp.177-188.
8. Adamiak SJ, Mackie K Watt RG, Webb R, Sinclair KD. 2005. Impact of nutrition on oocyte quality: Cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biology of Reproduction*. 73:918-926.
9. Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. 2001. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 121, 647-653.
10. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 2002. Molecular Biology of The Cell. 4^a Ed. Garland Publishing; 1010-1036. New York, USA.

11. Al-Katanani YM, Webb DW, Hansen PJ. 1999. Factors affecting seasonal variation in 90 day non-return rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *Journal of Dairy Science* 82, 2611–2615.
12. Al-Katanani YM, Paula-Lopes FF, Hansen PJ. 2002. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 85, 390-396.
13. Ali A, Sirard MA. 2002. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocyte during *in vitro* maturation. *Biology of Reproduction*; 66: 901-905.
14. Alm H, Torner H, Tiemann U, Kanitz W. Influence of organochlorine pesticides on maturation and postfertilization development of bovine oocytes *in vitro*. *Reprod Toxicol* 1998; 12:559-563.
15. Amman RP, Schanbacher BD. 1983. Physiology of male reproduction. *Journal Animal Science*. 57, Suppl 2: 380-403.
16. Argov N, Moallem U, Sklan D. 2005. Summer heat stress alters the mRNA expression of selective-uptake and endocytotic receptors in bovine ovarian cells. *Theriogenology* 64: 1475–1489.
17. Arlotto T, Schwartz JL, First NL, Leibfried RML. 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*; 45: 943-956.
18. Austin CR, Short RV. 1982. *Reproduction in Mammals*. Cambridge University Press. Inglaterra.
19. Austin EJ, Mihm M, Evans ACO, Knight PG, Ireland JLH, Ireland JJ, Roche JF, 2001. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles on the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biol. Reprod.* 64: 839–848.
20. Avery B, Greve T. 1995. Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for *in vitro* insemination. *Theriogenology* 44: 871-878.

21. Badinga L, Thatcher W.W, Wilcox C.J. 1994. Effect of season on follicular dynamics and plasma concentrations of estradiol-17 β , progesterone and luteinizing hormone in lactating Holstein cows. *Theriogenology*, v.42, n.8, p.1263- 1274.
22. Baker TG. 1982. Ooogenesis and ovulation. *Reproduction Mam.* 3-25.
23. Baldassarre H, Furnus CC, De Matos DG, Pessi H. 1996. *In vitro* production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. *Theriogenology* 45: 707-717.
24. Ballard CB. Intracellular lipids in *Bos indicus* and *Bos taurus* oocytes. 2007. Masters Thesis. Interdepartmental Program in Animal and Dairy Sciences, Louisiana State University and Texas A&M University. College Station, Texas. USA.
25. Baruselli, PS, Gimenes LU, Sales JNS. 2007. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. V.31, n.2, p. 205-211
26. Bauchart D. 1993. Lipid absorption and transport in ruminants. *Journal of Dairy Science* 76: 3864–3881.
27. Bavister B, TA Rose-Hellekant, T Pinyopummintr. 1992. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology* 37,127-146.
28. Bavister B. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reproduction*. 1: 91-148.
29. Bavister B, Boatman D. 1997. The neglected human blastocyst revisited. *Human Reproduction*. 12: 1607-1610.
30. Beg MA, Ginther OJ. 2006. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction* 132: 365-377.
31. Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Ginther OJ. 2002. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. *Biol. Reprod.* 66: 120-126.

32. Bevers MM, Izadyar F. 2002. Role of growth hormone receptor in oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 197:173-178.
33. Betthausen J, Forsberg E, Augenstein M, Childs L, Eilertsen K, Enos J, Forsythe T, Golueke P, Jurgella G, Koppang R, Lesmeister T, Mallon K, Mell G, Misica P, Pace M, Pfister-Genskow M, Strelchenko N, Voelker G, Watt S, Thompson S, Bishop M. 2000. Production of cloned pigs from *in vitro* systems. *Nat Biotechnol*. 18: 1055-1059.
34. Block J, Hansen PJ. 2007. Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-1 on survival of *in vitro*-produced embryos following transfer to lactating dairy cows. *Theriogenology* 67: 1518-1529.
35. Blondin P, Sirard MA. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 41: 54-62.
36. Bó GA, Adams GP, Caccia M. 1995. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progesterone and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science*. V.39, p. 193-204.
37. Bó GA, Adams GP, Pierson RA. 1994. Follicular waves dynamic after estradiol 17 β treatment of heifers with or without a progesterone implant. *Theriogenology*, v. 41, p.1555-1569.
38. Boland NI, Humpherson PG, Leese HJ, Gosden RG. 1994. The effect of glucose metabolism on murine follicle development and steroidogenesis *in vitro*. *Hum Reprod* 9: 617-623.
39. Bozzola JJ y Russell L.D. 1999. Electron Microscopy. Second Edition. Jones and Bartlett Publishers. Cap 20: 567-569. Boston, USA.
40. Brackett BG, Zuelke KA. 1983. A review of bovine fertilization *in vitro* *Theriogenology* 19: 1-15.
41. Bredbacka K, Bredbacka P. 1996. Glucose controls sex-related growth rate differences of bovine embryos produced *in vitro*. *Jornal of Reproduction and Fertility* 106: 169-172.

42. Bremel RD, Homan EJ, Howard TH. 2001. Current and future promises of transgenesis of agricultural livestock in a global marketplace. *Journey Dairy Science*; 84 1-8.
43. Brinster R, Thomson J. 1996. Development of eight cell mouse embryos *in vitro*. *Exp Cell Res*; 42: 308-315.
44. Brogliatti GM, Adams GP. 1996 Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogenology*. 45 (6): 1163 - 1176.
45. Brown BW, Radziewick T. 1998. Production of sheep embryos *in vitro* and development of progeny following single and twin embryo transfers. *Theriogenology* 49: 1525-1536.
46. Byrne AT, J Southgate, Brison DR, Leese HJ. 1999. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryos using TUNEL. *Journal Reproduction Fertility* 117: 97-105.
47. Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. 2002. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Molecular Reproduction and Development* 62: 489-495.
48. Calder MD, Caveney AN, Smith LC, Watson AJ. 2003. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation *in vitro*. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1 (14):1-12.
49. Calderon I, Healy D. 1993. Endocrinology of IVF. En: Trounson A, Gardner DK, Handbook of *in vitro* fertilization. Boca Raton: CRC Press, 1-17. Florida, USA.
50. Camargo LSA, Viana JHM, Sa WF, Ferreira AM, Vale Filho VR. 2006. Developmental competence of oocytes from prepubertal *Bos indicus* crossbred cattle. *Animal Reproduction Science*. 85: 53-59.
51. Carvalho JB, Carvalho NA, Reis EL. 2008. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*: v.69, n.2, p.167-175.

52. Cesari A, Kaiser GG, Mucci N, Vicenti A, Fornés MW, Alberio RH. 2006. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production *in vitro*. *Theriogenology* 66: 1185-1193.
53. Cetica P, Pintos L, Dalvit G, Beconi M. 2002. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation *in vitro*. *Reproduction* 124: 675-681.
54. Chen L, Wert SE, Hendrix EM, Russell PT, Cannon M, Larsen WJ. 1990. Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. *Molecular Reproduction and Development*. 26: 236–247
55. Chenoweth PJ. 1994. Aspects of reproduction in female *Bos indicus* cattle: A review. *Aust. Vet. J.* 71:422-426.
56. Chian RC, Niwa K y Nakahara H. 1992. Effect of sperm penetration *in vitro* on completion of first meiosis by bovine oocytes arrested at various stages in culture. *J Reprod Fertil* 96: 73–78.
57. Chian RC, Okuda K, Niwa K. 1995. Influence of cumulus cells on *in vitro* fertilization of bovine oocytes derived from *in vitro* maturation. *Animal Reproduction Science* 38: 37–48.
58. Cho SR, CG Hur, JG Lee, GL Rho, SY Choe, CS Park. 2001. Serum-free culture system enhances viability following cryopreservation of bovine embryos produced *in vitro*. *Theriogenology* 55,333.
59. Cho SR, SK Cho, SL Lee, HJ Lee, SY Choe, GJ Rho. 2002. Enhanced cryosurvival of bovine blastocysts produced *in vitro* in serum-free medium. *Journal Assitant Reproduction Genetic* 19: 487-492.
60. Choi YH, Carnevale EM, Seidel GE Jr, Squire EL. 2001. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology* 56: 661-670.
61. Conti M, Andersen CB, Richard F, Mehats C, Chun SY, Horner K, Jin C, Tsafiriri A. 2002. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 187:153–159.

62. Coull, G.D, B.K. Speake, M.E. Staines, P.J. Broadbent, TG McEvoy. 1997. Lipid and fatty acid composition of zona-intact sheep oocytes. *Theriogenology* 49:129.
63. Cox JF, Hormazabal J, Santa Maria A. 1993. Effect of the cumulus on *in vitro* fertilization of bovine matured oocytes. *Theriogenology* 40: 1259–1267.
64. Crosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE. 2000. Ultrastructural Morphometry of Bovine Compact Morulae Produced *in vivo* or *in vitro*. *Biology of Reproduction* 62 (5): 1459-1465.
65. Crozet N, Ahmed-Ali M, Dubos MP. 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Journal Reproduction Fertility* 103: 293-8.
66. Das A, Davis MA, Rudel LL. 2008. Identification of putative active site residues of ACAT enzymes. *J Lipid Res.* 49(8): 1770-81
67. De La Torre-Sánchez JF, Gardner DK, Preis K, Gibbons J, Seidel GE. 2006. Metabolic regulation of in-vitro-produced bovine embryos. II. Effects of phenazine ethosulfate, sodium azide and 2, 4-dinitrophenol during post-compaction development on glucose metabolism and lipid accumulation. *Reproduction Fertility and Development.* 18: 597–607.
68. De Loos F, Vliet C, Maurik P, Kruip AM. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. *Gam Res*; 24: 197-204.
69. Diez C, DL Bourhis Y, Heyman JP, Renard. 1996. Effect of partial lipid removal from *in vitro* produced bovine zygotes on further development *in vitro* and on the freezing tolerance of blastocysts. *Theriogenology* 45:166.
70. Diez C, Le Bourhis D, Heyman Y, Degrolard J. Guyader-Joly C, Renard JP. 2001. Effect of partial lipid removal from bovine zygotes on further survival and freezing tolerance of *in vitro* -produced blastocysts. *Theriogenology* 55 (4): 923-936.
71. Ding J, Wu Z, Crider BP, Ma Y, Li X, Slaughter C. 2000. Effect of isoform variation on the atpase activity and phospholipid specificity. *Biol. Chem.* 275: 23378-23386.

72. Ding L, Wang H, Lang W, Xiao L. 2002. Protein Kinase C- ϵ Promotes Survival of Lung Cancer Cells by Suppressing Apoptosis through Dysregulation of the Mitochondrial Caspase Pathway. *J. Biol. Chem.* 277: 35305-35313.
73. Dobrinsky JR, Johnson LA, Rath D. 1996. Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. *Biol Reprod* 55: 1069–1074.
74. Dode MAN Mattos L, Rumpf R. 2002. *In vitro* production of bovine embryos in SOF medium under high oxygen tension. *Theriogenology* 57: 661.
75. Donnay I, Verhaegue B, Neirinckx G. 2004. Enriching a defined maturation medium improves subsequent embryonic development of oocytes cultured in small and large groups. *Reproduction Fertility and Development* 16:274.
76. Dorland M, DK Gardner, AO Trounson. 1994. Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. *J Reprod Fert* 13:70.
77. Dorland M, Gardner DK, Trounson AO. 1995. Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. *J Reprod Fert. Abstr. Ser.* 13: 70.
78. Dorn CG, Kraemer DC. 1987. Bovine embryo grading. Texas A&M University, College of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Physiology and Pharmacology, College Station, Texas.
79. Downs SM. 1993. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogenology* 39:65-80.
80. Driancourt M. 1991. Follicular dynamics in sheep y cattle. *Theriogenology.* 35: 55-79.
81. Ducibella T, Duffy P, Buetow J. 1994. Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. *Biology of Reproduction.* 50:467-73.
82. Ducolomb RYC, Romo GS, González MH, Fierro PRC, Betancourt RM. 2004. Fertilización *in vitro* para la producción de animales transgénicos. *Agropecuaria* I (2): 25-37.
83. Duque P, Gomez E, Dias N, Facal C, Hidalgo C, Diez C. 2003. Use of two replacements of serum during bovine embryo culture *in vitro*. *Theriogenology* 59: 889-899.

84. Duranthon V., Renard J.P. 2001. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology* 65: 102-115.
85. Durnford R, Stubbings RB. 1992. The influence of serum and oviductal cell during *in vitro* maturation on blastocyst development. *Theriogenology* 37: 205.
86. Eckert J, Niemann H. 1995. *In vitro* maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein free media. *Theriogenology* 43: 1211-1225.
87. Ectors FJ, Fontes RS, F Thonon, Deval A, Figueiredo JR, Beckers FJ, Ectors F. 1992. Effect of non-protein medium during *in vitro* maturation on *in vitro* development of bovine embryos. *Theriogenology* 37, 206.
88. Ekstedt E, Soderquist L, Ploen L. 1986. Fine structure of spermatogenesis and Sertoli cells (Epitheliocytus sustentans) in the bull. *Anat Histol Embryo*; 15(1):23-48
89. Ellington JE, Carney EW, Farrell PB, Simkin ME, Foote RH. 1990. Bovine 1–2-cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. *Biol Reprod.* 43, 97–104.
90. Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM. 1999. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* 13: 1035-1048
91. Enright B.P., Lonergan P. Dynnes A., Fair T., Ward F.A., Yang X., Boland M.P. 2000. Culture of *in vitro* produce bovine zygotes *in vitro* vs *in vivo*: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology* 54:659-673.
92. Eppig, JJ, O'Brien MJ. 1994. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol of Reprod* 54: 191-207.
93. Eppig JJ. 1996. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reproduction Fertility and Development.* 8 (4):485-489.
94. Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola F, Hirao Y. 1997. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biol Reprod* 56: 976-984.

95. Eppig JJ. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122: 829–838
96. Epstein C, Smith S. 1973. Amino acid uptake and protein synthesis in preimplantation mouse embryos. *Dev. Biol* 33: 171-184.
97. Erbach GT, Lawitts, JA, Papaioannou VE, Biggers JD. 1994. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. *Biol Reprod* 345: 1027–1033.
98. Fair T, Hulshof SCJ, Hyttel P, Greve T, Boland M. 1995 Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. *Molecular Reproduction and Development* 46: 208-215.
99. Fair T, Hulshof SCJ, Hyttel P, Greve T, Boland M. 1997. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anatomy and Embryology*. 195:327-336.
100. Fair T, Lonergan L, Boland M. 2001. The acquisition of developmental competence in bovine oocytes. *Theriogenology* 25:1.
101. Fair T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science* 78. 203-216.
102. Farin PW, Crosier AE, Farin CE. 2001. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology* 55: 151-170.
103. Fatehi AN, Zeinstra EC, Kooij RV, Colenbrander B, Bevers MM. 2002. Effect of cumulus cell removal of *in vitro* matured bovine oocytes prior to *in vitro* fertilization on subsequent cleavage rate. *Theriogenology* 57: 1347-1355
104. Ferguson EM, HJ Leese. 1999. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 116: 373-378.
105. Fernandes CES, Dode MAN, Pereira D, Silva AEDF. 2008. Effects of scrotal insulation in Nellore Bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with *in vitro* fertilization ability. *Theriogenology* 70: 1560-1568.
106. Figueiredo RA, Barros CM, Pinheiro OL. 1997. Ovarian follicular dynamics in Nelore Breed (*Bos indicus*). *Theriogenology*. V. 47, p.1489-505.

107. Figuereido JR, Rodriguez APR, Amorin CA. 2002. Manipulacion de ovocitos incluidos em folículos ováricos preantrais. *Biotécnicas Aplicadas á Reproducao Animal*. Sao Paulo. *Livraria Valera* 1a. Edición pp195-226.
108. Fischer-Brown A, Monson R, Parrish J, Rutledge J. 2002. Cell allocation in bovine embryos cultured in two media under two oxygen concentrations. *Zygote*. 10:341-348.
109. Fischer-Brown A, Crooks A, Leonard S, Monson R, Northey D, Rutledge JJ. 2005. Parturition following transfer of embryos produced in two media under two oxygen concentrations. *Animal Reproduction Science* 87:215-228.
110. Flynn TJ, Hillman N. 1978. Lipid Synthesis from [U-14 C] Glucose in Preimplantation Mouse Embryos in Culture. *Biology of Reproduction*. 19: 922-926.
111. Fortune JE, Rivera GM, Yang MY. 2004. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science* 82-83: 109-126.
112. Fouladi-Nashta AA, R Alberio, M Kafi, B Nicholas, KHS Campbell, R Webb. 2005. Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in preimplantation bovine embryos. *Reproductive Biomedicine Online* 10: 497-502.
113. Fukui Y. 1990. Effect of follicle cells on acrosome reaction, fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development* 26: 40-46.
114. Gardner DK. 1994. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biol Int*. 18: 1163-1179.
115. Gardner D, Lane M. 1996. Alleviation of the "2-cell block" and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Hum Reprod* 11: 2701-2712.
116. Gardner D, Lane M. 1997. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF. *Hum Reprod* 3: 367-382.

117. Gardner D. 1998. Culture and transfer of human blastocyst increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil and Steril* 69: 84-88.
118. Gasque-Gómez R. 2008. Enciclopedia Bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. P 14. Mexico, DF
119. Gibbons JR, Beal WE, Krisher RL, Faber EG, Pearson RE, Gwauzdaskas FC. 1994. Effect of once versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology* 42 405-419.
120. Gérard N, Loiseau S, Duchamp G, Seguin FB. 2002. Analysis of the variations of follicular fluid composition during follicular growth and maturation in the mare using proton nuclear magnetic resonance (1HNMR). *Reproduction*. 124: 241–248.
121. Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. 2004. Oocyte–somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal Reproduction Science* 82–83: 431–446.
122. Gilchrist RB, Thompson JG. 2007. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology* 67: 6–15.
123. Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. 2008. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod*. 14(2): 159-177.
124. Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. 1989a. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fertil*. V.87. p.223-230.
125. Ginther, OJ, Knopf L, Kastelic JP. 1989b. Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biology of Reproduction*. V.41, n.2, p.247-254.
126. Ginther, O.J. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Science*. V. 60-61, p.61-79.
127. Gómez E, D Diez. 2000. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development in vitro. *Animal Reproduction Science*. 58: 23-37.

128. Goncalves PBD, Visintin JA, Oliveira MAL, Montanger MM, Costa LFS. 2001. Produção *in vitro* de embriões. Biotécnicas Aplicadas á Reproducao Animal. Sao Paulo. Livraria Valera 1a. Edición. 195-226.
129. Goodhand KL, Watt RG, Staines ME, Hutchinson JS, Broadbent PJ. 1999. *In vivo* oocytes recovery and *in vitro* embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology* 51: 951-961.
130. Gordon, I. 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. Capítulo 8. Use of embryos and oocytes in commercial practice and research. Pp. 355-441. CAB International. University Press. Cambridge. Inglaterra.
131. Gordon I. 2003. Laboratory production of cattle embryos. 2nd Edition. Biotechnology in Agriculture Series. Wallingford: CAB International. Inglaterra.
132. Gordon I, Lu KH. 1990. Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology* 33: 77-87.
133. Gosden RG, Hunter RH, Telfer E, Torrance C, Brown N. 1988. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *J Reprod Fertil.* 82: 813-825.
134. Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y, Ogawa K 1988. Pregnancies after co-culture of *cumulus* cells with bovine embryos derived from *in-vitro* fertilization of *in-vitro* matured follicular oocytes. *J Reprod and Fertil* 83: 753-758.
135. Goud PT, Goud AP, Qian C, Laverge H, Van der Elst J, de Sutter P, Dhont M. 1998. *In-vitro* maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. *Hum Reprod.* 13: 1638– 1644
136. Greve T, Avery B, Callesen H. 1993. Viability of *in vivo* and *in vitro*-produced bovine embryos. *Reproduction Domestic Animals.* 28: 645-654.
137. Griswold MD, Heckert L, Linder C. 1995, The molecular biology of the FSH receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Jun; 53 (1-6): 215-8.
138. Grupen CG, Nagashima H, Nottle MB. 1997. Asynchronous meiotic progression in porcine oocytes matured *in vitro*: a cause of polyspermic fertilization?. *Reprod Fert Develop.* 9:187–191.

139. Gutiérrez-Adán A, Lonergan P, Rizos D, Ward FA, Boland MP, Pintado B, De la Fuente J. 2001. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 55: 1117-1125.
140. Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 55: 1187-1194.
141. Ginther OJ. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 61-79.
142. Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K (2001) Follicle selection in monovular species. *Biol. Reprod.* 65: 638-647.
143. Gyu-jin R, Balasubramanian S, Dong-sik K, Son WJ, Cho SR, Kim JG. 2007. Influence of *in vitro* oxygen concentrations on preimplantation embryo development, gene expression and production of hanwoo calves following embryo transfer. *Molecular Reproduction and Development.* 74:486-496.
144. Hafez ESE. 1995. Avaliação de semen. Reproducao Animal 6ª Ed. Sao Paulo. Brasil.
145. Hafez ESE, Hafez B. 2002. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Editorial Mc Graw Hill. México
146. Hagemann L.J. 1999. Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. *Theriogenology* 51: 449-459.
147. Haggarty P, Wood M, Ferguson E, Hoad G, Srikantharajah A. 2006. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. *Human Reproduction.* 21: 766-773.
148. Hansen P.J. 2006. Realizing the promise of IVF in cattle- an overview. *Theriogenology.* 65: 119-125.
149. Harvey AJ, Kind KL, Pantaleon M, Armstrong DT, Thompson JG. 2004. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Biol Reprod.* 71: 1108-1119.
150. Harvey, AJ. 2007. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Anim. Reprod. Sci.* 98:113–128.

151. Hendriksen PJM, Vos P. 2000. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. *Theriogenology*. 53: 11-20
152. Holm P, PJ Booth, 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.
153. Holm P, Callesen H. 1998. *In vivo* versus *in vitro* produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reproduction Nutrition Development*. 38: 579-594.
154. Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. 1999. High bovine blastocysts development in a static *in vitro* production systems using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 52: 883
155. Hosoc M, Shioya Y. 1995. Distribution of cortical granules in classified bovine oocyte. *Theriogenology* 45:274.
156. Holy L. 1991. Bases Biológicas de la Reproducción Bovina. Editorial Diana pp 47-50. México.
157. Hoshi H. 2003. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology* 59: 675-685.
158. Houdebine LM. 2002. Animal transgenesis: recent data and perspectives. *Biochimie* 84: 1137-1141.
159. Hurtt A, Landim-Alvatenga F, Seidel GE, Squires EL. 2000. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethyleneglycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology* 54: 119-128.
160. Hyttel P, Greve T, Callesen H. 1989. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 38: 35-47.
161. International Embryo Transfer Society (IETS). 1998. Manual of the International Embryo Transfer Society. 3rd Ed. Savoy, IL, USA.

162. Ireland JJ, Roche JF. 1982, Effect of progesterone on basal LH and episodic LH and FSH secretion in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 64; 295-302.
163. Ireland JLH, Jiménez-Krassel F, Winn ME, Burns DS, Ireland JJ. 2004. Evidence for autocrine and paracrine roles of α 2-macroglobulin in regulation of estradiol production by granulosa cells and development of dominant follicles. *Endocrinology* 145: 2784-2794.
164. Isachenko V, Soler C, Isachenko E, Perez-Sanchez F, Grishchenko V. 1998. Vitrification of immature porcine oocytes: Effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology* 36:250-253.
165. 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 oocyte improves parthenogenetic activation and subsequent development to the blastocyst stage. *Theriogenology* 63:1277–1289.
166. Iwata H, Minami N, Imai H. 2000. Postnatal weight of calves derived from *in vitro* matured and *in vitro* fertilized embryos developed under various oxygen concentrations. *Reprod Fertil Dev.* 12: 391-396.
167. Izadyar F, Zeinstra E, Colenbrander B, Venderstichele HMG, Bevers MM. 1998. *In vitro* maturation of bovine oocytes in the presence of bovine activine A does not affect embryonic development. *Animal Reproduction Science* 45: 37-45.
168. Johnson MH, Everitt BJ. 1980. Essential Reproduction. Blackwell Scientific Publications. P. 285. Oxford UK.
169. Joyce IM, Clark AT, Pendola FL, Eppig JJ. 2000. Comparison of recombinant growth differentiation factor-9 and oocyte regulation of KIT ligand messenger ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles. *Biol Reprod.* 63: 1669-1675.
170. Juengel JL, Sawyer HR, Smith PR, Quirke LD, Heath DA, Lun S, Wakefield SJ, McNatty KP. 2002. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. *Mol Cell Endocrinol.* 191: 1-10.

171. Kane MT. 2003. A review of *in vitro* gamete maturation and embryo culture and potencial impact on future animal biotechnology. *Animal Reproduction Science* 79: 171-190.
172. 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.
173. Karnovsky MJ. 1965. A formaldehyde-Glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: 137A. Abstract 270.
174. Kawayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. 2005. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive Biomedicine Online* 11: 300-308.
175. Keskinetepe L, Burnley CA y Brackett BG. 1995. Production of viable bovine blastocysts in defined *in vitro* conditions. *Biology of Reproduction* 52: 1410-1417
176. Keskitenpe L, Brackett B. 2006. *In vitro* developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biology of Reproduction* 55: 333-339.
177. Khurana NK, Niemann H. 2000. Effects of quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology* 54: 741-756.
178. Kikuchi KH, Ekwall P, Tienthai Y, Kawai J, Noguchi H, Kaneko H, Rodriguez-Martinez. 2002. Morphological features of lipid droplet transition during porcine oocyte fertilization and early embryonic development to blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Zygote* 10:355-366.
179. Kim NH, Chung KS y Day BN. 1997. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments during fertilization and parthenogenesis in pig oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* 111: 143–149.
180. Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M, Fukui Y. 2001. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes. *Reproduction* 122: 131-138.

181. Kimura K, Spate LD, Green MP, Roberts RM. 2005. Effects of D-glucose concentration, D-fructose, and inhibitors of enzymes of the pentose phosphate pathway on the development and sex ratio of bovine blastocysts. *Molecular Reproduction and Development*. 72: 201-207
182. Krisher RL, Lane M, Bavister BD. 1999. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultures in semi-defined and defined culture media. *Biology of Reproduction*. 60: 1345-1352.
183. Kubelka M, Motlik J, Fulka JJ, Prochazka R, Rimkevickova Z, Fulka J. 1988. Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and paminobenzamidine block. *Gamete Research*. 19:423-431.
184. Kuwayasha R, Rosillo A, Rodriguez R, Mcgill Jr. 2005. Expression Levels of ACAT1 and ACAT2 genes in the liver and intestins of baboons with high and low lipemic responses to dietary lipids. *Journal of Nutricional Biochemistry* 16: 714-721.
185. Krisher RL, Bavister BD. 1998. Responses of oocytes and embryos to the culture enviroment *Theriogenology*; 49: 103-114.
186. Krisher RL, Brad AM, Herrick JR, Sparman ML, Swain JE. 2007. A comparative analysis of metabolism and viability in porcine oocytes during *in vitro* maturation. *Animal Reproduction Science* 98. 72-96.
187. Kruip T, Den Daas JHG. 1997. *In vitro* produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology* 42: 675-684.
188. Kuran M, JJ Robinson, ME Staines, TG McEvoy. 2001. Development and de novo protein synthetic activity of bovine embryos produced *in vitro* in different culture systems. *Theriogenology* 55: 593-606.
189. Lane M, Gardner D. 1997. Differential regulation of mouse embryo developments and viability by amino acids. *Journal of Reproduction and Fertility* 109: 153-164.
190. Lane M. 2001. Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress *in vitro*. *Theriogenology* 55, 225-236.

191. 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.
192. Lawrence JL, Payton RR, Godkin JD, Saxton AM, Schrick FN, Edwards JL. 2004. Retinol improves development of bovine oocytes compromised by heat stress during maturation. *J Dairy Sci* 87: 2449–2454
193. Lazzari G, Wrenzycki C, Hermman D, Ducci R, Kruij T. 2002. Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biology of Reproduction* 67: 767-775.
194. Leese H. 1991. Metabolism of the preimplantation mammalian embryo. Review of Reproductive Biology 13: 35-72.
195. Leibo SP, Loskutoff NM. 1993. Cryobiology of *in vitro* -derived bovine embryos. *Theriogenology*, 40: 81-94.
196. Leibo SP, Pollard JW, Martino A. 1995. Chilling and freezing sensitivity of "reassembled" *in vitro* derived bovine embryos. *Theriogenology* 43: 265 abstr.
197. Leibfried L, First NL. 1980. Follicular control of meiosis in the porcine oocyte. *Biology of Reproduction* 23: 705-709.
198. Lequarre AS, Marchandise J, Moreau B, Massip A, Donnay I. 2003. Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for *in vitro* produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition. *Biol Reprod.* 69: 1707-1713.
199. Lequarre AS, Marchandise J, Moreau B, Massip A, Donnay I. 2003. Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for *in vitro* produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition. *Biol Reprod.* 69: 1707-1713.
200. Lequarre AS, Vigneron C, Ribaucour F, Holm P, Donnay I, Dalbiés-Tran R, Callesen H, Mermillod P. 2005. Influence of antral follicle size on oocyte characteristic and embryo development in the bovine. *Theriogenology* 63: 841-859.

201. Leroy JLMR, Goossens L, Geldhof A, Vanholder T, Opsomer G. 2004. Embryo quality and color in holstein friesian and belgian blue cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 16: 211-211.
202. Leroy JLMR, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomera G, Van Soom A, Bols PEJ, de Kruif A. 2004. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Animal Reproduction Science* 80: 201–211.
203. Leroy JLMR, Vanholder T, Mateusen B, Christophe A, Opsomer G. 2005. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes *in vitro*. *Reproduction*. 130: 485-495.
204. Leese HJ, Lenton EA. 1990. Glucose and lactate in human follicular fluid: concentrations and interrelationships. *Hum Reprod*. 5: 915–919.
205. Li R, Norman RJ, Armstrong DT, Gilchrist RB. 2000. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biol Reprod*. 63: 839–845.
206. Lim JM, Reggio BC, Godke RA, Hansel W. 1999. Development of *in vitro*- derived bovine embryos cultured in 5% CO² in air or in 5% O², 5% CO² and 90% N². *Hum Reprod*. 14: 458–464.
207. Liu J, Van Der Elst J, Dhont M. 2003. *In vitro* parthenogenetic development of mouse oocytes following reciprocal transfer of the chromosome spindle between *in vivo*-matured oocytes and *in vitro*-matured oocytes. *Biol Reprod*. 68: 186–189.
208. Lonergan P, O'Kearney-Flynn M, Boland MP. 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.
209. Lonergan P, Rizos D, Gutierrez Adan A, Fair T, Boland MP. 2003. Oocytes and embryo quality effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reproduction of Domestic Animals* 38: 259-267.

210. Lonergan P, Rizos D, Kanka J, Nemcova L, Mbaye AM, Kingston M, Wade M, Duffy P, MP Boland. 2003. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction* 126: 337–346.
211. Lonergan P, HG Pedersen, D Rizos, T Greve, PD Thomsen, T Fair, A Evans, MP Boland. 2004. Effect of the postfertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocysts. *Biol Reprod* 71: 1096-1100.
212. Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. 1994 Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*. 37(1): 48-53.
213. Lonergan P, O'Kearney-Flynn M, Boland MP. 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.
214. Lonergan P, Fair T, Corcoran D., Evans A. 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF derived embryos. *Theriogenology* 65: 137-152.
215. Long CR, Pryor JH, Wells K, Lane M, Gardner DK. 2003. *In vitro* development and subsequent pregnancy rates of *in vitro* produced embryos in various culture media *Theriogenology* 53: 299
216. Lu KH, Gordon I, Gallagher M, McGovern H. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *Veterinary Record* 121: 259-260.
217. Luciano AM, Modina S, Vassena R, Milanesi E, Lauria A, Gandolfi F. 2004. Role of intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentration and oocyte–cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during *in vitro* maturation of bovine oocyte. *Biol Reprod* 70: 465–472.

218. Lucy MC, De la Sota RL, Staples CR. 1992. Ovarian follicular population in lactating dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin (somatotribone) or saline and fed diets differing in fat content and energy. *Journal of Dairy Science*, v.76, p.1014-1027.
219. Lucci CM, Rumpf R, Figueredo JR, Bao SN. 2002. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. *Theriogenology* 57: 1467-1483.
220. McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JS, Speake BK. 2000. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *Reproduction*. 118: 163-170.
221. McNatty KP, Moore LG, Hudson NL, Quirke LD, Lawrence SB, Reader K, Hanrahan JP, Smith P, Groome NP y Laitinen M. 2004. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. *Reproduction* 128: 379–386.
222. Machatkova M, Jokesova E, Petelikova J, Dvoracek V. 1996. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the oestrus cycle. *Theriogenology* 45: 801-810.
223. Maddocks S, Kern S, Setchell BP. 1995. Investigating local regulation of the testes of ruminants. *J Reprod Fertil Suppl* 45: 309-19.
224. Makarevich AV, Markkula M. 2002. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during *in vitro* maturation and culture. *Biology of Reproduction* 66: 386-392.
225. Massip A, Mermillod P, Dinnyes A. 1995. Morphology and biochemistry of *in vitro* produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Human Reproduction* 10: 3004-3011.
226. Massip A, Mermillod P, Van Langendockt A, Touze JL, Dessy F. 1995. Survival and viability of fresh and frozen-thawed *in vitro* bovine blastocysts. *Reprod Nutr Develop*. 35:3 10.
227. Matsushita S, Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. 2004. Effect of low-temperature bovine ovary storage on the maturation rate and development potential of follicular oocytes after

in vitro fertilization, parthenogenetic activation, or somatic cells nucleus transfer. *Animal Reproduction Science*. 84:293-301.

228. Mayes MA, Sirard MA. 2001. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. *Theriogenology* 55: 911-922.

229. McEvoy TG, GD Coull, PJ Broadbent, JS Hutchinson, BK Speake. 2000. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* 118:163-170.

230. McEvoy TG. 2003. Manipulation of domestic animal embryos and implications for development. *Reprod Dom Anim.* 38: 268-275

231. Mermillod P, Lonergan P, Carolan C, Khatir H, Poulin N, Cognie Y. 1998 *In vitro* oocyte maturation in domestic ruminants. *Contraception, Fertilité, Sexualité*. 24(7-8): 552.

232. Mermillod P, Tomanek M, Marchal R, Meijer L. 2000. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. *Molecular Reproduction and Development* 55: 89-95.

233. Merton JS, Ask B, Onkundi DC, Mullaart E, Colenbrander B, Nielen M. 2009. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up-*in vitro* production embryo-production program. *Theriogenology*. 2009; 72 (7): 885-893.

234. Mohan JM, Lindsay KS. 1995. Spermatozoa selected by discontinuous Percoll density gradient exhibit better motion characteristics, more hyperactivation, and longer survival than direct swim-up. *Fertility Sterility* 64: 160-165.

235. Mohan M, Ryder S, Claypool PL, Geisert RD, Malayer JR. 2002. Analysis of gene expression in the bovine blastocyst produced *in vitro* using suppression-subtractive hybridization. *Biol Reprod* 67(2): 447-53.

236. Moor RM, Trounson AO. 1997. Hormonal and follicular factors affecting maturation on sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. *Journal of Reproduction and Fertility* 49: 101-109.

237. Moor RM, Gandolfi F. 1987. Molecular and cellular changes associated with maturation and early development of sheep eggs. *Journal of Reproduction and Fertility* 34: 55-69.
238. Moore K, Rodriguez-Sallaberry CJ, Kramer JM, Johnson S, Wrocklawska ES, Goicoa Niasari-Naslaji A. 2007. *In vitro* production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: Effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. *Theriogenology* 68: 1316-1325.
239. Morgan M, Faik P. 1981. Carbohydrate metabolism in cultured animal cells. *Bioscience Reports* 1: 669-686.
240. Motlik J, Fulka J, Flechon JE. 1984. Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* 76: 31-37.
241. Mucci N, Aller J, Kariser G, Hozbor F, Cabodevila J, Albeiro R. 2006. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 65: 1551-1562.
242. Murphy MG, Boland MP, Roche JF. 1990. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post partum beef suckler cows. *Journal of Reproduction and Fertility*. V.90, p.523-533, 1990.
243. Murray JD. 1999. Genetic modification of animals in the next century. *Theriogenology*, 51: 149-159.
244. Murzamadiyev AM, Dombrovskii N, Isabekov BS, Dzhienbava RS. 1983. Effect of sheep serum obtained at different stages of estrous cycle on the maturation of oocytes in intact follicles. *Izvestiya Akademii Nauk Kazakhskoi Ssr-Seriya Biologicheskaya* 4: 67-70 (Abstract).
245. Nagai T. 2001. The improvement of *in vitro* maturation system for bovine and porcine oocyte. *Theriogenology* 55: 1291-1301.
246. Nagano M, Katagiri S, Takahashi Y. 2006. Relationship between bovine oocyte morphology and *in vitro* developmental potential. *Zygote*. 14: 53-61.

247. Nedambale TL, Dinnyes A, Groen W, Dobrinsky JR, Tian XC, Yang X. 2004. Comparison on *in vitro*-fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 62: 437-449.
248. Norris RP, Freudzon L, Freudzon M, Hand AR, Mehlmann LM, Jaffe LA. 2007. Gs-Linked receptor maintains meiotic arrest in mouse oocyte, but luteinizing hormone does not cause meiotic resumption by terminatin receptor G-s signaling. *Developmental Biology*. 310: 240-249.
249. O'Brien JK, Catt SL, Ireland KA, Maxwell WMC, Evans G. 1996. *In vitro* and *in vivo* development capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. *Theriogenology* 47: 1433-1443.
250. Oliveira ATD, Lopes RFF, Rodrigues JL. 2006. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced *in vitro* with diferente serum concentrations. *Reproduction Domestic Animal*. 41: 129-136.
251. Olson SE, Seidel Jr GE (2000a): Culture of *in vitro*-produced bovine embryos with vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients. *Biol Reprod* 62.
252. Olson SE y Seidel Jr GE. 2000b. Reduced oxygen tension and EDTA improve bovine zygote development in a chemically defined medium. *J Anim Sci*. 78:152-157.
253. Orsi NM, HJ Leese, 2004. Amino acid metabolism of preimplantation bovine embryos cultured with bovine serum albumin or polyvinyl alcohol. *Theriogenology* 61: 561-572.
254. Osborn JC, Moor RM. 1983. The role of steroid signals in the maturation of mammalian oocytes. *J Steroid Biochem*. 19(1A): 133-7.
255. Otsuka F, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. 2001. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *J Biol Chem*. 276: 11387-11392
256. Oyamada T, Fukui Y. 2004. Oxygen tension and medium supplements for *in vitro* maturation of bovine oocyte cultured individually in a chemically defined medium. *J. Reprod. Dev*. 50:107-117.

257. Ozawa M, Tabayashi D, Latief, TA, Shimizu T, Oshima I, Kanai, Y. 2005. Alterations in follicular dynamics and steroidogenic abilities induced by heat stress during follicular recruitment in goats. *Reproduction* 129: 621–630.
258. Palasz AT, Beltran BJ, De la Fuente P, Martinez MF, Gutieirrez-Adan A. 2006. The effect of amino acids and hyaluronan on bovine embryo development and gene expression pattern. *Reprod Fertil Dev.* 18:194-194.
259. Palma GA. 2001. Evaluación morfológica de embriones bovinos. En: Biotecnología de la Reproducción. Palma G. Editor. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. 125-148.
260. Park SY, Cho N, Chang I, Chung JH, Min YK, Lee MK, Kim KW, Kim SJ, Lee MS. 2005. Effect of PK11195, a peripheral benzodiazepine receptor agonist, on insulinoma cell death and insulin secretion. *Apoptosis* 3: 537-544
261. Park J, Hong JY, Yong HY, Hwang WS, Lim JM, Lee ES. 2005. High oxygen tension during *in vitro* oocyte maturation improves *in vitro* development of porcine oocyte after fertilization. *Anim. Reprod. Sci.* 87:133–141.
262. Paula-Lopes FF, Lima RS, Satra RA, Barros CM. 2013. Influence of cattle genotype (Influence of cattle genotype (*Bos indicus* vs. *Bos taurus*) on oocyte and preimplantation embryo resistance to increased temperature. *J. Anim. Sci.* 91:1143-1153.
263. Paterson K, Renkeman K, Burden L, Halleck M, Shlegel R, Williamson P. 2006. Lipid specific activation on the murine (P4ATPase II) Atp8a1 (ATPase II) *Biochemistry.* 45: 5367-5375.
264. Partridge RJ, HJ Leese. 1996. Consumption of amino acids by bovine preimplantation embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 8:945-950.
265. Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H. 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Dev.* 31(1): 63-7.

266. Pavlok A, Motlik J, Kanka J, Fulka J. 1988. *In vitro* techniques of bovine oocyte maturation, fertilization and embryo culture resulting in the birth of a calf. *Reproduction Nutrition Development*. 19: 224-225.
267. Pavlok A, Kaláb P, Bobák P. 1997. Fertilisation competence of bovine normally matured or aged oocytes derived from different antral follicles: morphology, protein synthesis, H1 and MBP kinase activity. *Zygote* 5: 235–246.
268. Pavlok A. 2000. D-penicillamine and granulose cells can effectively extend the fertile life span of bovine frozen–thawed spermatozoa *in vitro*: effect on fertilization and polyspermy. *Theriogenology* 53: 1135–1146.
269. Pertoft, H. 2000. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 44:1-30.
270. Picton H, Briggs D, Gosden R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol* 145:27-37.
271. Pierson RA, Ginther OJ. 1998. Ultrasonographic appearance of the bovine uterus during the estrous cycle. *J. Vet. Med. Assoc.* 190:995-1002.
272. Pierson RA, Adams GP. 1999. Remote assessment of ovarian response and follicular status using visual analysis of ultrasound images. *Theriogenology*. 51: 47-57.
273. Pinheiro OL, Barros CM, Figueiredo RA. 1998. Estrus behavior and the estrus-to ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F₂ α or norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology*, v.49, p.667-681.
274. Pinyopummintr T, BD Bavister. 1994. Development of bovine embryos in a cell-free medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology* 41: 1241-1249.
275. Prakash P, Leykin L, Chen Z, Toth T, Sayegh R, Schiff I, Isaacson K. 1998. Preparation by differential gradient centrifugation is better than swim-up in selecting sperm with normal morphology. *Fertility and Sterility* 69: 37-39.

276. Pryor J, Walker J, Seidel GE, Hasler JF, Looney CR, Kraemer DC, Romo S. 2007. Comparison between conventional direct transfer freezing and vitrification for the cryopreservation of *in vivo* embryos from Brahman cattle. *Reproduction Fertility and Development*: 9: 224-225.
277. Pryor JH, Looney CR, Romo S, Kraemer DC, Long CR. 2011. Cryopreservation of *in vitro* produced bovine embryos: effects of lipid segregation and post-thaw laser assisted hatching. *Theriogenology* 75: 24-33.
278. Pinyopummintr T, Bavister BD. 1991. *In vitro*-matured/*in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop in to morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biol Reprod* 45:736-742.
279. Pinyopummintr T, Bavister BD. 1996. Effects of amino acids on development *in vitro* of cleavage-stage bovine embryos into blastocysts. *Reprod Fertil Dev*. 8: 835-841.
280. Quinn P. 1995. Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate. *Journal of Assisted Reproduction and Genetic*. 12: 97-105.
281. Rabiee AR, Lean IJ, Gooden JM, Miller BG, Scaramuzzi RJ. 1997. An evaluation of transovarian uptake of metabolites using arterio-venous differences methods in dairy cattle. *Animal Reproduction Science* 48: 9–25.
282. Rabiee AR, Lean IJ, Gooden JM, Miller BG. 1999. Relationships among metabolites influencing ovarian function in the dairy cow. *J Dairy Sci*. 82: 39–44.
283. Reichenbach HD, Liebrich J, Berg U, Brem G. 1992. Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* 95: 363-370.
284. Reitzer LB, Wice D, Kennel D. 1980. The pentose cycle: control and essential function in HeLa cell nucleic acid synthesis. *J. Biol. Chem* 255: 5616-5626.
285. Revel F, Mermillod P, Peynot N, Renard JP, Heyman Y. 1995. Low developmental capacity of *in vitro* matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 103: 115-120.

286. Reynolds WL, TM DeRouen, JW High. 1963. The age and weight at puberty of Angus, Brahman and Zebu cross heifers. *J. Anim. Sci.* 22:243. (Abstr.).
287. Rief S, Sinowatz F, Stojkovic M, Einspanier R, Wolf E, Prella K. 2002. Effects of novel co culture stem development, metabolism and gene expression of bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction* 124: 585.
288. Rieger D, Luciano AM, Modina S, Pocar P, Lauria A, Gandolfi F. 1998. The effects of epidermal growth factor and insulin like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil.* 112: 123–130.
289. Rieger D, McGowan LT, Cox SF, Pugh PA, Thompson JG. 2002. Effect of 2,4-dinitrophenol on the energy metabolism of cattle embryos produced by in vitro fertilization and culture. *Reproduction Fertility and Development* 14: 339-43.
290. Rizos D, Lonergan P, Boland M, Arroyo García R, Pintado B, De la Fuente J. 2002a. Analysis of Differential Messenger RNA Expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: Implication for Blastocyst Quality. *Biology of Reproduction* 66: 589-595.
291. Rizos D, Fair T, Papadopoulus MP, Boland MP, Lonergan. 2002b. Ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology* 57: 682.
292. Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-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.
293. Rhodes, F.M.; Fitzpatrick, L.A.; Entwistle, K.W. 1995. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrus. *Journal of Reproduction and Fertility.* V.104, p.41-49.

294. Rodriguez H, Torres C, Valdes X, Guerra H, Pastor LM, Maccallini G, Bustos-Obregon E. 2001. The acrosomic reaction in stallion spermatozoa: inductive effect of the mare preovulatory follicular fluid. *Biocell*. 25: 115–120.
295. Rodriguez KF, Farin CE. 2004. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reproduction Fertility and Development* 16: 55-67.
296. Romo GS. 1993. Biotecnología reproductiva: Avances en ganado bovino. *Veterinaria México* 24: 177-184.
297. Romo S. 1997. *In vitro* production of crossbred cattle embryos. PhD Dissertation. Texas A&M University. College Station, Texas. USA.
298. Romo S. 2000. Avances biotecnológicos aplicados a la reproducción bovina. Capítulo XX. Pp. 223-234. En: Mejoramiento Animal: Reproducción Bovinos. Segunda Edición. División Sistema de Universidad Abierta y Educación a Distancia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
299. Rosenkrans CF, First NL 1991. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: effects of amino acids and vitamins. *Theriogenology*. 35, 266.
300. Roth Z, Hansen PJ. 2004a. Involvement of apoptosis in disruption of oocyte competence by heat shock in cattle. *Biol Reprod*. 71, 1898–1906.
301. Roth Z, Hansen PJ. 2004b. Sphingosine 1-phosphate protects bovine oocytes from heat shock during maturation. *Biol Reprod*. 71: 2072–2078
302. Roth Z, Meidan R, Braw-Tal R, Wolfenson D. 2000. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *J Reprod Fertil*. 120: 83–90
303. Roth Z, Meidan R, Shaham-Albalancy A, Braw-Tal R, Wolfenson D. 2001a. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction*. 121: 745–751.

304. Roth Z, Arav A, Bor A, Zeron Y, Braw-Tal R, Wolfenson D. 2001b. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heatstressed cows. *Reproduction*. 122: 737–744.
305. Roth Z, Arav A, Braw Tal R, Bor A, Wolfenson D. 2002. Effect of treatment with follicle stimulating hormone or bovine somatotropin on the quality of oocytes aspirated in the autumn from previously heat stressed cows. *Journal of Dairy Science* 85: 1398-1405.
306. Roth Z, Aroyo A, Yavin S, Arav A. 2008. The antioxidant epigallocatechin gallate (EGCG) moderates the deleterious effects of maternal hyperthermia on follicle enclosed oocytes in mice. *Theriogenology* 70: 887–897.
307. Russell DF, Baquir S, Bordignon J, Betts S. 2006. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Molecular Reproduction and Development* 73: 1255-1270.
308. Ryuichi S, H Tsujii, H Abe, S Yamashita, H Hoshi. 1999. Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing medium during early embryonic development. *J. Reprod. Dev.* 45:97-103.
309. Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First NL, Parrish JJ, Memili E. 2007. Developmental Potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Animal Reproduction Science* 101: 225-240.
310. Salisbury JG, O'Connor PJ, Saffhill R. 1978. Molecular size and fidelity of DNA polymerase alpha from the regenerating liver of the rat. *Biochim Biophys Acta*. 517(1): 181.
311. Salustri A, Yanagishita M, Underhill CB, Laurent TC, Hascall VC. 1992. Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Developmental Biology*. 151: 541-551.
312. Salomone DF, Damiani P, Fissore RA, Robl JM, Duby RT. 2001. Biochemical and Developmental Evidence That Ooplasmic Maturation of Prepubertal Bovine Oocytes Is Compromised. *Biology of Reproduction*. 64:1761–1768.

313. Samardzija M, Karadjole M, Matkovic M, Cergolj M, Getz I, Dobranic T, Tomaskovic A, Petric J, Surina J, Grizelj J, Karadjole A. 2006. A comparison of BoviPure and Percoll on bull sperm separation protocols of IVF. *Animal Reproduction Science* 91: 237-247.
314. Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC. 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci.* 85, 2803–2812.
315. Sata R, H Tsuji, H Abe, S Yamashita, H Hoshi. 1999. Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serumfree and serum-containing medium during early embryonic development. *Journal of Reproduction and Development* 45: 97-103.
316. Savio JD, Keenan L, Boland MP. 1988. Pattern of growth of dominant follicles during oestrus cycle in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility.* v.83, p.663-671.
317. Seidel GE. 2006. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology* 65: 228-235.
318. Shamsuddin M, Larsson B, Rodriguez-Martinez H. 1993. Maturation-related changes in bovine oocytes under different culture conditions. *Animal Reproduction Science.* 31:49-60.
319. Shamsuddin M, Rodriguez-Martinez H. 1994. Fine structure of bovine blastocysts developed either in serum-free medium or in conventional co-culture with oviduct epithelial cells. *Journal of Veterinary Medicine* 41: 307-316.
320. Shioya Y, Masuda H, Hanada A, Nakahara T. 1989. Incidence of chromosomal anomalies in early bovine embryos derived from *in vitro* fertilization. *Gamete Research* 83-91.
321. Silcoux RW, Powell KL, Kiser TE. 1993. Ability of dominant follicles to respond to exogenous GnRH administration is dependent on their stage of development. *Journal of Animal Science.* V.71, suppl. 1, p.219 (Abstract).
322. Sinclair KD, Rooke JA, McEvoy TG. 2003. Regulation of nutrient uptake and metabolism in pre-elongation ruminant embryos. *Reproduction.* Suppl, 61: 371-385.

323. Singh M, Meyer EM, Simpkins JW. 1997 The effect of ovariectomy and estradiol replacement on brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid expression in cortical and hippocampal brain regions of female Sprague-Dawley rats. *Endocrinology, Endocrine Society* 136: 2320-2324.
324. Sirard MA. 1989. Temporary inhibition of *in vitro* meiotic resumption by adenylate cyclase stimulation in immature bovine oocytes. *Theriogenology*; 31: 257.
325. Sirard M, Coenen K. 1993. The co-culture of cumulus-enclosed bovine oocytes and hemi-sections of follicles: Effects on meiotic resumption. *Theriogenology*. 40: 933-942.
326. Sirard MA., Richard F, Blondin P, Robert C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65: 126-136.
327. Sirard MA, Desrosier S, Assidi M. 2007. *In vivo* and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and development competence. *Theriogenology* 68: 71-76.
328. Siriois J, Fortune, JE. 1988. Ovarian follicular dynamics during the oestrus cycle in heifers monitored by real time ultrasonography. *Biology of Reproduction*. V. 39, p.308-317.
329. Sirisathien S, Hernandez-Fonseca HJ, Brackett BG. 2003. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development *in vitro*. *Anim Reprod Sci*. 77:21-32.
330. Slimane W, Heyman Y, Lavergne Y, Humbolt P, Renard JP. 2000. Assessing chromosomal abnormalities in 2-cell bovine *in vitro*- fertilized embryos by using fluorescent in situ hybridization with three different cloned probes. *Biol Reprod*. 62:628- 635.
331. Snijders SEM, Dillon P, O'Callaghan D, Boland MP. 2000. Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on *in vitro* oocyte development in dairy cows. *Theriogenology* 53: 981–98.
332. Somfai T, Bodo S, Nagy S, Papp AB, Ivancsics J, Baranyai B, Gocza E, Kovacs A. 2002. Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawd bull spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animal*. 37: 285-290.

333. Soto P, Smith LC. 2009. BH4 peptide derived from BclxL and Bax-inhibitor peptide suppresses apoptotic mitochondrial changes in heat stressed bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 76: 637–646.
334. Statistical Analysis System. 2000. SAS User Guide V8: Basics and Statistics. SAS Institute, Cary N. C. USA.
335. Statsoft Ltd (V5). 1997. Reino Unido.
336. Steel R, Hasler JF. 2004. Pregnancy rates resulting from transfer of fresh and frozen holstein and jersey embryos. *Reproduction, Fertility and Development*. 16: 182-183.
337. Steeves TE, Gardner DK. 1999. Metabolism of glucose, pyruvate and glutamine during the maturation of oocytes derived from pre-pubertal and adult cows. *Molecular Reproduction and Development*. 54: 92–101.
338. Stojkovic M, Kolle S, Peinl S, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Thompson JG, Wenigerkind H, Reichenbach HD, Sinowatz F, Wolf E. 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.
339. Sturmev RG, Leese HJ. 2003. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction*. 126:197-204.
340. Sudano MJ, Paschoal DM, Rascado TS, Crocomo LF, Guastali MD, Maziero RR, Guaitolini CRF, Magalhães LCO, Martins A, Machado R, Landim-Alvarenga, FC. 2011. 89 Phenazine ethosulfate and fetal calf serum effect in the ultrastructure and development of *in vitro*-produced bovine embryos. *Reproduction Fertility Development* 24: 157–157.
341. Sung LY, F Du, J Xu, W Chang, TL Nedambale, J Zhang, S Jiang, XC Tian, X Yang. 2004. The differential requirement of albumin and sodium citrate on the development of *in vitro* produced bovine embryos. *Reproduction Nutrition Development*. 44: 551-564.
342. Suss U, Wuthrich K, Stranzinger G. 1998. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured *in vitro*. *Biology of Reproduction* 38: 871-880.

343. Takada N, Ohisa N, Numabe T, Ishikawa Y. 1991. Production of twin calves by transfer of embryos produced *in vitro*. *Veterinary Record*. 128: 307.
344. Talbot P, Shur BD, Myles DG. 2003. Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biology of Reproduction*. 68(1): 1-9.
345. Taneja M, Bols PEG, Van de Velde A, Ju JC, Schreiber D, Tripp DW, Levine H, Echelard Y, Riesen J, Yang X. 2000. Developmental Competence of Juvenile Calf Oocytes *In vitro* and *In vivo*: Influence of Donor Animal Variation and Repeated Gonadotropin Stimulation. *Biology of Reproduction*. 62 (1): 206-213.
346. Tanghe S, Soom AV, Mehrzad J, Maes D, Duchateau L, Kruif A. 2003. Cumulus contributions during bovine fertilization *in vitro*. *Theriogenology* 60: 135-149.
347. Tanghe S, Van Soom A, Atercky V, Maes D, Kruif A. 2002. Assessment of different sperm quality parameters to predict *in vitro* fertility of bulls. *Reproduction of Domestic Animals* 73: 127-132.
348. Tervit H, Whittingham D, Rowson L. 1972. Successful culture of *in vitro* of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*. 89: 573-578.
349. Thibodeaux JK, Menézo Y, Roussel JD, Hansel W, Goodeaux LL, Thompson DL, Godke RA. 1992. Coculture of *in vitro* fertilized bovine embryos with oviductal epithelial cells, originating from different stages of the estrous cycle. *Journal of Dairy Science*. 75: 1448-1455.
350. Thibier M. 2006. Transfers of both *in vivo* derived and *in vitro* produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. *International Embryo Transfer Soc Newsletter*. 24:12-18.
351. Thilbaut C, Szöllosi D, Gérard M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reproduction Nutrition Development*. 27: 865-896.
352. Thompson JG. 1995. Lamb birth weight following transfer is affected by the culture system used for pre-elongation development of embryos. *Biology of Reproduction* 53: 1385-1391.

353. Thompson JG. 1997. Comparison between *in vivo*-derived and *in vitro* produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reproduction Fertility and Development*. 9: 341-354.
354. Thompson JG. 2000. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos- a decade of achievement. *Journal Animal Reproduction Science* 60: 263-275.
355. Thompson JG. 2007. Culture without the petri-dish. *Theriogenology* 67: 16–20
356. Thompson JG, Allen NW, McGowan LT, Bell ACS, Lambert MG, 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.
357. Thompson, JG, Partridge RJ, Houghton FD, Cox CI, Leese HJ. 1996. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by *in vitro* derived bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 106:299-306.
358. Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, Tervit HR. 1992. *In vitro* development of early sheep embryos is superior in medium supplemented with human serum compared with sheep serum or human serum albumin. *Animal Reproduction Science* 29: 61-68.
359. Tominaga, K, Shimizu M, Ooyama S, Izaike Y. 2000. Effect of lipid polarization by centrifugation at different developmental stages on post-thaw survival of bovine *in vitro* produced 16-cell embryos. *Theriogenology*. 53:1669-1680.
360. Toyoda Y, Naito K. 1990. IVF in domestic animals. Fertilization in mammals. Plenum Press. 335-347. New York. USA.
361. Tsafiri A, Chun SY, Zhang R, Hsueh AJ, Conti M. 1996. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cell: Studies using selective phosphodiesterase inhibitors. *Developmental Biology*. 78:393-402.
362. Tsang TE, Khoo PL, Jamieson RV, Zhou SX, Ang SL, Behringer R, Tam PP. 2001. The allocation and differentiation of mouse primordial germ cells. *Int J Dev Biol*. 45: 549-555.

363. Tsujii H, Nakamura Y, Hamano KI. 2002. *In vitro* effects of insulin on glucose and lipid metabolism in rat embryos. *Animal Science Journal*. 73: 185-189.
364. Tulsiani DRP, AbouHauila A, Loeser C, Pereira M. 1998. The biological and functional significance of the sperm acrosoma and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Experimental Cell*. 240: 151-164.
365. Van den Hurk R, Dijkstra G, Van Mil FN, Hulshof SC, Van den Ingh TS. 1995. Distribution of the intermediate filament proteins vimentin, keratin, and desmin in the bovine ovary. *Molecular Reproduction and Development*. 41:459-467.
366. Van den Hurk R, Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63: 1717-1751.
367. Viana, JHM, Ferreira AM, Sá WF. 1999. Características morfológicas e funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. *Arquivo brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.51, n.3, p.251-256.
368. Visintin JA, Martins JFP, Bevilacqua EM, Mello MRB, Nicacio AC. 2002. Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: are they really different? *Theriogenology* 57: 345-359.
369. Vanroose G, Nauwynck H, Van Soom A, Vanopdenbosch E, De Kruif A. 1999. Effect of bovine herpesvirus-1 or bovine viral diarrhoea virus on development of *in vitro*-produced bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*. 54: 255-263.
370. Vanroose G, Van Soom A, de Kruif A. 2001. From co-culture to defined medium: state of the art and practical considerations. *Reproduction of Domestic Animals* 36: 25- 28.
371. Van Wagendonk -de Leeuw, AM, den Daas JHG, Rall W.F. 1994. Pregnancy rates in a comparative field trial of vitrification and one-step dilution or conventional slow freezing and three-step dilution of bovine embryos are similar. *Theriogenology* 41: 326.
372. Varago FC, Saliba WP, Alvim MTT, Vasconcelos AB, Oliveira CH, Stahlberg R, Lagares MA. 2006. Vitrification of *in vitro* produced Zebu embryos. *Animal Reproduction* 3:353-358.

373. Waldrop JG, Stringfellow DA, Galik PK, Riddell KP, Riddell MG, Givens MD, Carson RL 2004. Infectivity of bovine viral diarrhoea virus associated with *in vivo*- derived bovine embryos. *Theriogenology* 62: 387-397.
374. Wang S, Y Liu, GR Holyoak, TD Bunch. 1997. The effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre- and postcleavage-stage bovine embryos cultured in modified CR2 and M199 media. *Animal Reproduction Science* 48: 37-45.
375. Wang Y, Storeng R, Dale PO, Abyholm T, Tanbo T. 2001. Effects of follicular fluid and steroid hormones on chemotaxis and motility of human spermatozoa *in vitro*. *Gynecol Endocrinol.* 15: 286–292.
376. Wani NA. 2002. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant Research* 44: 89-95.
377. Wani NA, Wani GM, Khan MZ, Salahudin S. 2000. Effect of oocyte harvesting techniques on *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization in sheep. *Small Ruminant Research* 36: 63-67.
378. Wani NA, Wani GM, Khan MZ, Sidiqi MA. 1999. Effect of different factors on the recovery rate of oocytes for *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization procedures in sheep. *Small Ruminant Research* 34: 71-76.
379. Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M, Lonergan P. 2002. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology* 57: 2105-2117.
380. Wassarman PM, Bleil J, Fimiani C, Florman H, Greve J, Kinloch R, Moller C, Mortillo S, Roller R, Salzmann G, Vazquez M. 1989. The mouse egg receptor for sperm: a multifunctional zona pellucida glycoprotein. In *The Mammalian Egg Coat: Structure and Function*. *Journal of Cell Science* 109: 18-37.
381. Wehrman ME, Welsh TH, Williams GL. 1991. Diet-induced hyperlipidemia in cattle modifies the intrafollicular cholesterol environment, modulates ovarian follicular dynamics, and hastens the onset of postpartum luteal activity. *Biol Reprod.* 45: 514–522.

382. Weidle UH, Lenz H, Brem G. 1991. Genes encoding a mouse monoclonal antibody are expressed in transgenic mice, rabbits and pigs. *Gene*. 98: 185-191.
383. Wheeler MB, Clark SG, Beebe DJ. 2004. Developments in *in vitro* technologies for swine embryo production. *Reprod Fertil Dev*. 16: 15–25.
384. Wildt ED. 1990. Potential applications of IVF technology for species conservation. En: Bavister B, Cummings J, Roldan ERS (Eds). Fertilization in mammals. Massachusetts, USA; Serono Symposia. Pp. 349-364.
385. Wilmut I, Clark AJ. 1991. Basic Techniques for transgenesis. *Journal of Reproduction and Fertility* 43: 265-275.
386. Wilmut I, Whitelaw CB. 1994. Strategies for production of pharmaceutical proteins in milk. *Reproduction Fertility and Development* 6: 625-630.
387. Wilson RD, Fricke PM, Leibfried Rutledge MI, Rutledge JJ, Syverson Penfield CM, Weigel KA. 2006. *In vitro* production of bovine embryos using sex sorted sperm. *Theriogenology* 65: 1007-1015.
388. Whitaker M. 1996. Control of Meiotic Arrest. *Review of Reproduction*. 1:127-135.
389. Wolfenson D, Lew BJ, Thatcher WW, Graber Y, Meidan R. 1997. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. *Animal Reproduction Science* 47:9–19.
390. Wolfenson D, Inbara G, Rotha Z. 2004. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology*. V. 62, p. 1042-1055.
391. Wrenzycki C, Herrmann D, Keskinetepe L, Martins A Jr, Sirisathien S, Brackett B, Niemann H. 2001. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum Reprod*. 16:893-901.
392. Xu KP, Greve T. 1988. A detailed analysis of early events during *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *J Reprod Fert*. 82:127-134.

393. Xu KP, Heier R, Greve T. 1987. Dynamic changes of estradiol concentration in two culture systems for bovine oocyte maturation *in vitro*. *Theriogenology* 27: 245-255.
394. Xu KP, Pollard JW, Rorie RW, Plante L, King WA, Betteridge KJ. 1990. Pregnancy rates following transfer of bovine embryos produced by *in vitro* maturation, fertilization and co-culture. *Theriogenology* 33: 351.
395. Yamashita S, Abe H, Itoh T, Satoh H, Hoshi H. 1999. A serum-free culture system for efficient *in vitro* production of bovine blastocysts with improved viability after freezing and thawing. *Cytotechnology* 31: 123-131.
396. Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In Knobil E, Neill JD, Eds. *The Physiology of Reproduction*. New York Raven Press, USA. 189-317.
397. Yang X, Kubota C, Suzuki H, Taneja M, Bols PEJ, Presicce GA. 1998. Control of oocyte maturation in cows biological factors. *Theriogenology* 49: 471-482.
398. Yang M, Rajamahedran R. 2002. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. *Animal Reproduction Science* 70: 159-169.
399. Young LE, Sinclair KD, Wilmut I. 1998. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Review of Reproduction*. 3:155-163.
400. Young E, Guttierrez CG, Butterwith SG, Robison JJ, Broadbent PJ, McEvoy TG. 1999. Altered IGF binding protein expression is associated with large offspring syndrome in fetal sheep. *Theriogenology* 51:196.
401. Younis AI, Brackett BG. 1991. Importance of cumulus cells and insemination interval for development of bovine oocytes into morulae and blastocysts *in vitro*. *Theriogenology* 36: 11-21.
402. Yuan YQ, Van Soom A, Coopman FO, Mintiens K, Boerjan ML, Van Zeveren A, De Kruif A, Peelman LJ. 2003. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology* 59: 1585-1596.

403. Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochoy A, Sklan D, Arav A. 2001. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction* 121: 447–454.
404. Zeron Y, Sklan D, Arav A. 2002. Effect of Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation on Biophysical Parameters and Chilling Sensitivity of Ewe Oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 61: 271-278.
405. Zhang L, Jiang J, Wozniak PJ, Yang X, Godke R. 1995. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development* 40: 338-344.

APÉNDICE 1.

PREPARACIÓN DE MEDIOS.

TALP Hepes

Reactivo	Final Mm	Mg/500ml
NaCL	114	3330
KCl	3.2	120
NaHCO ₃	2	84
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.34	23.8
Hepes	10	1200
Lactato de Sodio	10	930ul
Rojo Fenol (0.5%)	1ul/ml	500ul
CaCl ₂ 2H ₂ O*	2.0	150
MgCl ₂ 6H ₂ O*	0.5	50

*Adicionar al final

Ajustar el pH a 7.4 cerca del volumen final.

Adicionar agua al volumen final apropiado.

Verificar osmolaridad (265-285 mOSM).

Filtrar dentro de una botella estéril, almacenar a 4 °C y preparar cada dos semanas.

Medio de Maduración

Medio TCM 199

Marca	Reactivo	Cantidad
Gibco	Medio 199 (Sales de Earle)	4500 ul
	Suero Fetal Bovino	500 ul
	Suero de Vaca en estro	500 ul
	Serum Replacement ®	500ul
Gibco	Penicilina Estreptomina	25 ul

Medio de Fertilización (Medio de Tyrode-Lactato)

Compuesto	Final mM	mg/100ml
NaCl	114	666
KCl	3.2	23.5
NaHCO ₃	25.0	210.4
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.34	4.7
Lactato de Sodio	10	186ul
Rojo Fenol (.5%)	1ul/ml	100ul
CaCl ₂ 2H ₂ O*	2.0	30
MgCl ₂ 6H ₂ O*	0.5	10

*Adicionar a lo último

Verificar osmolaridad (280-300 mOSM).

Filtrar en una botella estéril.

Almacenar a 4 °C.

pH : 7.2

PENICILINA ESTREPTOMICINA (P/E)

A. Ingredientes

100 ml P/S solución (Gibco 15140-122)

B. Equipo

Baño Maria (35 °C)

Pipetas de 10 ml (VWR)

Tubos de 15 ml con tapa (VWR)

Microtubos de 1.5 ml (USA Scientific)

Tubos de Ensaye (VWR)

Rack de microtubos (USA Scientific)

C. Procedimiento

1. Descongelar la botella hasta que los cristales de hielo desaparezcan.
2. Transferir las alicuotas a los tubos deseados.
3. Tapar y marcar el tubo con el tipo de producto, número de lote y fecha.
4. Registrar en el tubo el químico ó producto, número de lote, fecha de expiración y técnico.
5. Almacenar a -20 °C.

SOLUCION SALINA 0.9%

A. Ingredientes

0.9 gramos NaCl (Sigma)

100 ml Embryos Tested Water (Sigma)

B. Equipo

Balanza

Filtro de 150 ml (VWR)

Frasco volumétrico de 100 ml (VWR)

Pipeta desechable 25 ml (VWR)

C. Procedimiento

1. Pesar 0.9 mg de NaCl y transferir dentro de un matraz 0.100 ml
2. Q.S. con agua con 100 ml volumen total.
3. Esterilizar con el filtro y almacenar a temperatura ambiente de manera indefinida.

Solución PH PARA FIV

A. Ingredientes.

2.5 ml de Solución Stock de Penicilamina (2 mM) almacenar a -80 °C (SOP: FIV-Stocks)

2.5 ml Solución Stock de Hipotaurina (1 mM) almacenada a -80 °C (SOP: FIV-Stocks)

4.0 ml de Solución salina al 0.9% (SOP: FIV Stocks)

B. Equipo

Pipeta desechable 5 ml (VWR)

Jeringas 10 ml (Norm-Ject)

Filtro Acrodisc.2 u (Pets)

Tubos de 15 ml con tapa (VWR)

Microtubos 1.5 ml (USA Scientific)

C. Procedimiento

1. Adicionar los ingredientes antes mencionados.

2. Filtrar con filtro de jeringa

3. Alicuotar en volumen de 500 ul y almacenar a - 80 °C no más de 2-4 semanas.

Descongelar brevemente antes de usar.

SOLUCION STOCK DE HIPOTOURINA (1 mM)

A. Ingredientes.

1.09 mg Hipotaurina (Sigma)

10 ml 0.9% Solución salina

B. Equipo

Balanza

Tubos de 15 ml con tapa (VWR)

Pipetas de 10 ml (VWR)

C. Procedimiento

1. Mezclar los ingredientes antes mencionados.

2. Alicuotar en volumen de 2.75 ml y congelar a - 80 °C por semanas.

3. Es preferible usar solución fresca.

PENICILAMINA (2 mM)

A. Ingredientes.

3 mg Penicilamina (Sigma)

10 ml de solución salina al 0.9% (SOP: FIV-Stocks)

B. Equipo

(Ver Hipotaurina)

C. Procedimiento

1. Mezclar los ingredientes.

2. Alicuotar en volumen de 2.75 ml y congelar a -80 °C durante 2-4 semanas.

3. Usar solución fresca.

SOLUCION DE HEPARINA PARA FIV

A. Ingredientes

Heparina (Sigma) temperatura ambiente.
0.9% Solución Salina (SOP: IVF-Stocks)

B. Procedimiento

Adicionar 50 mg de Heparina a 100 ml de solución salina al 0.9% para una concentración final de 0.5 mg/ml.

Medio de Fluido Sintético de Oviducto (SOF)

NaCl	0.629 g
KCl	0.0534 g
KH ₂ PO ₄	0.0162 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.0182 g
Acido lactico	60 mL
NaHCO ₃	0.21 g
Phenol Red	200 mL
Glutamina	0.02923
Aminoácidos esenciales	100 mL
Aminoácidos no esenciales	100 mL
Myo-inositol	0.005 g
Citrato de Sodio	0.001 g