

**J. Caínzos, M. Barrio, S. Ruibal, J.J. Becerra, L.A. Quintela y P.G. Herradón**

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON SUERO FETAL BOVINO (FCS),  
ALBUMIA SÉRICA BOVINA (BSA) Y POLIVINIL PIRROLIDONA (PVP) EN  
EL MEDIO DE MADURACIÓN IN VITRO DE LOS OVOCITOS BOVINOS**

Separata ITEA

INFORMACIÓN TÉCNICA ECONÓMICA AGRARIA, VOL. **109** N.º 1 (25-32), 2013

## Efecto de la suplementación con suero fetal bovino (FCS), albumina sérica bovina (BSA) y polivinil pirrolidona (PVP) en el medio de maduración in vitro de los ovocitos bovinos

J. Caínzos, M. Barrio, S. Ruibal, J.J. Becerra, L.A. Quintela<sup>1</sup> y P.G. Herradón

Unidad de Reproducción y Obstetricia. Dpto de Patología Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 27002. Lugo. Spain

### Resumen

El objetivo de este trabajo fue tratar de mejorar la producción in vitro de embriones bovinos y poder sustituir el suero de origen bovino, en la maduración in vitro de los ovocitos bovinos, sin que afecte a su posterior desarrollo. Para ello, se ha evaluado la influencia de tres suplementaciones macromoleculares distintas (suero fetal bovino, albumina sérica bovina y polivinil pirrolidona) en el medio de maduración de ovocitos, en atmósfera de baja tensión de oxígeno (6%). 809 complejos cumulo ovocito fueron divididos al azar en tres grupos, y cada uno de ellos fue madurado en presencia de una de las mencionadas suplementaciones: a) suero fetal bovino, n = 271; b) albumina sérica bovina, n = 272; c) polivinilpirrolidona, n = 266. Para evaluar las diferencias entre los grupos se procedió al recuento de cigotos divididos 48 horas postinseminación, porcentaje de blastocistos en días 7 y 8 de cultivo así como blastocistos totales y número total de células por blastocisto. No hemos encontrado diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en ninguno de los parámetros analizados. Con estos resultados podemos concluir que la maduración de los ovocitos bovinos en medio suplementado con polivinilpirrolidona, en condiciones de baja tensión de oxígeno, nos permite eliminar el suero, sin comprometer el posterior desarrollo hasta el estado de blastocisto.

**Palabras clave:** Ovocitos bovinos, suero fetal bovino, albumina sérica bovina, polivinilpirrolidona.

### Abstract

**Effect of fetal calf serum (FCS), bovine albumin serum (BSA) and polyvinyl pyrrolidone (PVP) supplementation in bovine oocyte maturation medium in vitro**

The aim of present study was to improve in vitro production of bovine embryos replacing bovine serum used for in vitro maturation without compromising the subsequent development to the blastocyst stage. Influence of three macromolecular supplements was tested (fetal calf serum, bovine serum albumin and polyvinylpyrrolidone) when they were supplemented of bovine oocyte maturation medium and cultured under low O<sub>2</sub> tension (6%). 809 cumulus-oocyte complexes, were randomly allocated in one of the three treatments groups, and each one of them was matured in the presence of a type of supplementation: a) fetal calf serum, n = 271; b) bovine albumin serum, n = 272 c) polyvinylpyrrolidone, n = 266. To evaluate the differences between groups we proceeded to count attached zygotes 48 hours postinsemination, percentage of blastocysts on days 7 and 8 postinsemination as well as total and total number of cells per blastocyst. No significant differences were found ( $p < 0.05$ ) in any of parameters analyzed. With these results we conclude that the bovine oocytes maturation in medium supplemented with polyvinylpyrrolidone, in low oxygen tension conditions, allows us to remove serum, without compromising the subsequent development to the blastocyst stage.

**Key words:** Bovine oocytes, fetal calf serum, bovine serum albumin, polyvinylpyrrolidone.

---

1. Autor para correspondencia.

## Introducción

La diferenciación de los ovocitos es un proceso largo que comienza durante la vida fetal y finaliza cuando el folículo preovulatorio alcanza la competencia completa para reanudar la meiosis y lograr con éxito tanto la maduración nuclear como la citoplásmica (Gosden et al., 1997).

Durante el período anterior al pico de LH y/o durante el período comprendido entre el pico de LH y la ovulación, el ovocito es capaz de responder a factores foliculares que determinan su capacidad de desarrollo posterior. Además durante este tiempo, bajo la influencia de factores aún desconocidos, los ovocitos se someten a una serie de cambios profundos en los que se ven involucrados tanto el núcleo como el citoplasma (Eppig, 1996). Estos cambios son esenciales para la formación de un ovocito con capacidad para su fecundación y posterior desarrollo, y deben de producirse de una manera sincrónica. La importancia de esta etapa de maduración in vitro (MIV) en la producción de embriones viene expresada por el hecho de que los cigotos procedentes de maduración in vivo tienen una mayor competencia para el desarrollo que los madurados in vitro (Van de Leemput et al., 1999). También se ha visto que las condiciones de MIV afectan a la capacidad de desarrollo de los ovocitos y los embriones, ejerciendo una marcada influencia en el estado de maduración nuclear, la tasa de división y la tasa de blastocistos producidos (Ali y Sirard, 2002; Watson et al., 2000; Rose y Bavister, 1992). Durante la MIV los ovocitos son sometidos a una serie de cambios citoplasmáticos antes del inicio de la maduración nuclear, lo que lleva a una competencia variable del embrión resultante (Moor et al., 1990). Además, se cree que la síntesis y almacenamiento de ciertas formas de ARNm y proteínas durante la MIV y las primeras fases de desarrollo embrionario son necesarios para alcan-

zar unas mayores tasas de desarrollo (Motlik y Fulk, 1986; Thibault et al., 1987). También se ha encontrado que la composición del medio de MIV altera los niveles de mRNA en los ovocitos (Watson et al., 2000).

La maduración, fecundación y posterior cultivo in vitro (MIV, FIV y CIV) de ovocitos bovinos pueden ser utilizadas para comprender los factores que intervienen en la adquisición de la capacidad de desarrollo ovocitario. Por esta razón, todos los productos de composición indefinida deberían de ser eliminados de los medios de cultivo. A pesar de que el FCS o la BSA suelen ser añadidos al medio como un suplemento de proteínas para mejorar la eficiencia de la MIV (Leibfried-Rutledge et al., 1986) y reducir la tensión superficial del medio, los diferentes lotes de estos suplementos pueden producir efectos muy variables durante el período de cultivo, que van desde efectos altamente estimulantes a fuertemente inhibitorios del desarrollo (McKieran y Bavister, 1992; Ali and Sirard, 2002; Lim et al., 2003). Además, estas fuentes de origen biológico incrementan del riesgo de contaminación viral o priónica y pueden llegar a provocar alteraciones o problemas durante el desarrollo fetal (Sagirkaya et al., 2007). Ocana-Quero et al., (1999) encontraron un alto número de ovocitos diploides, cuando eran madurados en presencia de altos niveles (50%) de suero de vaca en celo (ECS).

Por lo tanto, la sustitución de estas fuentes de proteína por una macromolécula sintética y no metabolizable, como puede ser el PVP o el PVA (polivinil alcohol), facilita la posibilidad de usar un medio de maduración definido y sin las variaciones entre lotes, estandarizando la maduración in vitro de embriones bovinos. Sin embargo, no podemos olvidar que las macromoléculas de origen no biológico también han demostrado ejercer una serie de efectos secundarios en los embriones de mamíferos. Orsi y Leese (2004) apreciaron un efecto negativo del PVA en la tasa de blas-

tocistos y en número total de células, cuando era utilizado en el CIV mientras que Ali y Sirdard (2002) describieron un incremento significativo en la tasa de producción de blastocistos, cuando los ovocitos eran madurados en presencia de PVP40 (frente a los madurados en BSA-V o PVA).

Por otra parte, debemos tener en cuenta que las condiciones atmosféricas también afectan a la producción de embriones in vitro (PIV) y la tensión parcial de oxígeno usada normalmente en la PIV es mucho más alta que las condiciones existentes en los folículos ováricos, donde el oxígeno se difunde desde los capilares a través de las capas de células de la granulosa y se establece un gradiente de concentración desde la periferia del folículo al ovocito (Godsen y Byatt-Smith, 1986). A pesar de eso, los resultados publicados usando un 20% o un 5% de O<sub>2</sub> durante los pasos de la PIV son controvertidos. Algunas investigaciones demostraron que cuando los ovocitos se maduran en condiciones de bajas tensiones de oxígeno (5 a 10%) favorece el posterior desarrollo embrionario (Kruip et al., 2000; Hashimoto et al., 2000), pero también hay experiencias que obtienen mejores resultados cuando se emplea un 20% para madurar los ovocitos in vitro (Oyamada y Fukui, 2004; Castro e Paula y Hansen, 2007). Para complicar la discusión, ciertos estudios demuestran que los ovocitos madurados en presencia de elevados niveles de O<sub>2</sub> sufren las consecuencias de las elevadas concentraciones de sustancias oxígeno reactivas (ROS) (Hashimoto et al., 2000) que provocan daño intracelular y son perjudiciales para el desarrollo embrionario (Batt et al., 1991).

Por todo ello, el objetivo del presente trabajo es dilucidar el papel de los suplementos de proteína en la maduración de ovocitos para poder elaborar un medio de maduración simple (fluido oviductal sintético (SOF)) con una atmósfera con bajo contenido en oxígeno (6%), ya que como se ha visto en trabajos an-

teriores la concentración de oxígeno en el fluido folicular se encuentra entre un 5-14% (Redding et al., 2006). Con este fin, se probaron, bajo esas circunstancias, los efectos de dos fuentes de proteína (FCS y BSA), así como la sustitución de estas fuentes por una macromolécula sintética (PVP-40), evaluando la tasa de división, el porcentaje de blastocistos obtenidos, la tasa de eclosión y el número de células de los blastocistos.

## Material y métodos

Al menos que se especifique lo contrario, todos los productos proceden de Sigma-Adrich (St. Louis, MO, USA). Los medios de maduración, fecundación y cultivo fueron preparados con agua de calidad Milli-Q (18.2 MΩcm), esterilizados a través de filtros de acetato de celulosa, de 0.20 μm Minisart® (Sartorius, 16534-K, Hannover, Alemania) y conservados a 4 °C durante un periodo máximo de dos semanas.

### Obtención de los ovocitos

Los ovarios procedían de hembras bovinas adultas sacrificadas en un matadero comercial de la provincia de Lugo y transportados al laboratorio en un tiempo inferior a 90 min. Los ovarios eran mantenidos a ~35 °C en 500 cc. de una solución de NaCl al 9%, suplementada con un 10% de la solución Antibiótico-Antimicótico (penicilina G 10000 UI/ml, sulfato de estreptomicina 10 mg/ml, anfotericina B 25 μg/ml).

Los CCOs, fueron extraídos mediante aspiración de los folículos con un tamaño comprendido entre 2 y 6 mm, utilizando una jeringa de 10 ml y una aguja de 18 G, y depositados en un tubo de fondo cónico de 50 ml (Falcon® Franklin Lakes, NJ. USA). Solo se seleccionaron aquellos CCOs que presentaban un cú-

mulo compacto, con tres o más capas de células de la granulosa, un citoplasma homogéneo y sin signos de picnosis.

Posteriormente, los CCOs se lavaron tres veces en placas Petri (Nunc Roskilde, Dinamarca) en medio SOF-Hepes, suplementado con 4 mg/ml de PVP-40 y 50 µg/ml de gentamicina.

#### Maduración in vitro

Para llevar a cabo este estudio se emplearon un total de 809 COCs divididos al azar, en tres grupos, y cada uno de ellos fue madurado en presencia de una macromolécula diferente: FCS (n = 271), BSA (n = 272) y PVP-40 (n = 266). El estudio se completó realizando 4 réplicas.

El medio de maduración fue el mismo en todos los casos, SOF-maduración modificado mediante la incorporación de 1% de BME EAA, 1% de MEM NEAA, 50 µg/ml de gentamicina, 0.5 µg/ml de FSH, 10 µg/ml de hCG y 1 µg/ml de 17β-estradiol. Las diferencias entre los tres grupos eran consecuencia de la macromolécula incorporada: 1) 10% de FCS; 2) 8 mg/ml de BSA FAF o 3) 8 mg/ml de PVP-40. La maduración se llevo a cabo durante 24 horas, en grupos de 10 COCs en microgotas de 50 µl, dispuestas bajo aceite mineral específico para cultivo embrionario, a 38,5 °C cultivados en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>, 6% de O<sub>2</sub> y 89% de N<sub>2</sub> a 38,5 °C y con la máxima humedad relativa.

#### Fecundación in vitro

Una vez completado el periodo de maduración, los ovocitos fueron lavados tres veces en medio SOF-Hepes. El medio de fecundación utilizado fue TL-Stock (Bavister y Yanagimachi, 1977), suplementado con 6 mg/ml de BSA FAF, 0.2 mM de piruvato, 50 µg/ml de gentamicina.

Para obtener los espermatozoides se descongeló una pajueta de 0,25 ml de semen de un

mismo eyaculado, mediante inmersión en agua a 38.5 °C durante 1 min. El contenido de la pajueta fue depositado sobre un gradiente discontinuo de Percoll (Pharmacia, Uppsala, Suecia) y centrifugado a 700 g durante 30 min a temperatura ambiente.

En cada una de las gotas de fecundación los ovocitos se pusieron en cocultivo con los espermatozoides (2×10<sup>6</sup> espermatozoides móviles/ml) y además se les añadió heparina 2 µg/ml y PHE (penicilamina 20 µM, hipotaurina 10 µM, epinefrina 1 µM). El cultivo conjunto de los espermatozoides y los ovocitos se mantuvo durante 18 horas a 38,5 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire y máxima humedad relativa.

#### Cultivo in vitro

Al concluir el periodo de fecundación, los presuntos cigotos fueron extraídos de las gotas y liberados de las células del cúmulo mediante 2 min. de agitación y sometidos a tres lavados en SOF-Hepes suplementado con 4 mg/ml de PVP-40 y 50 µg/ml de gentamicina. El medio utilizado para el cultivo fue SOF modificado (Takahashi y First, 1992) suplementado con un 5% de FBS, 0.3 mM de piruvato, 1 mM de L-glutamina, 1% de BME EAA, 1% de MEM NEAA, 10 µg/ml de insulina, 10 µg/ml de transferrina, 10 ng/ml de selenito sódico, 50 µg/ml de gentamicina. El cultivo se llevo a cabo en grupos de 15 cigotos en gotas de 50 µl que fueron preincubadas al menos 12 horas antes de depositar los mismos. El cultivo se mantuvo durante 10 días a 38,5 °C en una atmósfera por 5% CO<sub>2</sub>, 6% O<sub>2</sub> y 89% N<sub>2</sub> y máxima humedad.

#### Evaluación de resultados

Los estadios de desarrollo embrionario in vitro fueron evaluados de la siguiente manera: la tasa de división de los ovocitos a las 48 horas y el porcentaje de blastocistos (desde jío-

venas a eclosionados) en los días 7, 8 y totales, y el porcentaje de blastocistos eclosionados, considerando el día de fertilización como día cero (D0), de acuerdo con la clasificación de la International Embryo Transfer Society (IETS, Robertson y Nelson, 1998). En una segunda fase del experimento se evaluó, para cada uno de los tratamientos, el número total de células por blastocisto, usando el método de Pursel *et al.*, (1985) basado en la determinación de núcleos, mediante la tinción con Hoechst 33342 y posterior recuento en microscopio de fluorescencia.

#### Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron con el programa SPSS 17.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois), comparando los valores obtenidos para cada

una de las replicas de un mismo experimento, mediante un test Chi-cuadrado, para excluir posibles diferencias entre ellas, considerando la existencia de significación estadística cuando el valor de  $p < 0.05$

#### Resultados y discusión

Tras el análisis de los datos hemos podido comprobar que no hay diferencias estadísticamente significativas en la tasa de división ni en el número de blastocistos obtenidos ( $p < 0,05$ ) entre los tres tratamientos experimentales tras 8 días de cultivo.

Estos resultados difieren de los obtenidos por Mingoti *et al.*, (2009), los cuales, trabajando también en bajas tensiones de oxígeno en

Tabla 1. Efecto de la suplementación del medio de maduración, con diferentes macromoléculas (FCS, BSA, PVP) sobre las tasas de división, producción de blastocistos  
 Table 1. Effect of supplement maturation medium, with different macromolecules (FCS, BSA, PVP) on divided zygote rates, embryo production

| Tratamiento | Blastocistos/ Oocitos en MIV |                |             |               |
|-------------|------------------------------|----------------|-------------|---------------|
|             | N                            | N (%) División | N (%) Día 7 | N (%) Totales |
| FCS         | 271                          | 197 (72.7)     | 44 (16.2)   | 61 (22.5)     |
| BSA         | 272                          | 183 (67.3)     | 38 (14.0)   | 64 (23.5)     |
| PVP         | 266                          | 190 (71.4)     | 41 (15.2)   | 66 (24.8)     |

MIV, obtuvieron unas tasas de producción de embriones menores que en este ensayo (22.5, 23.5 y 24.8% para FCS, PVP y BSA), y además encontraban diferencias significativas entre los tres tratamientos, siendo el grupo suplementado con FCS el que presentaba una mayor tasa de desarrollo. Estas diferencias suponemos que se debe al diferente medio base empleado para la maduración (SOF vs TCM-199) y está en concordancia con los resultados

obtenidos por Lonergan *et al.*, (1994), que trabajando con TCM-199 y SOF, encontraron que la adición de suero mejoraba la maduración ovocitaria y el posterior desarrollo embrionario cuando era añadido al TCM-199 en comparación con el uso de suero en SOF. Del mismo modo, Ali y Sirard (2002) indicaron que el efecto del FCS como suplemento proteínico durante la MIV depende del medio de cultivo usado y, justifica la ne-

cesidad de evaluar la macromolécula también en función del medio base empleado. Se ha trabajado con un medio de maduración de composición definida basado en el empleo de un medio de cultivo simple, el fluido oviductal sintético (SOF), con el fin de evitar continuos cambios en la concentración de iones, sustratos energéticos, pH y osmolaridad en las distintas etapas de la PIV y en una atmósfera con bajo contenido en oxígeno (6%). Además, la eliminación de suplementos de origen animal, FCS y BSA, permite reducir al mínimo los riesgos sanitarios.

Las tasas de división y producción de blastocistos del grupo de BSA son similares a los obtenidos en ensayos previos, 67.3% y 23.5% respectivamente, (Orsi y Leese, 2004). También se ha establecido que el uso de BSA como única fuente de proteína durante la MIV de ovocitos bovinos retardaba la maduración nuclear y disminuía su capacidad de desarrollo, en cuanto a la producción de mórulas y blastocistos (Ali y Sirard, 2002). Sin embargo, en nuestro ensayo estas diferencias entre grupos para la división de los cigotos y la producción de blastocistos no son significativas.

Tabla 2. Número de células por blastocisto en función de la suplementación del medio de maduración

*Table 2. Number of cells per blastocyst according to maturation medium supplementation*

| Maduración | Número de células | N  |
|------------|-------------------|----|
| FCS        | 122 ± 32          | 22 |
| BSA        | 126 ± 37          | 15 |
| PVP-40     | 109 ± 29          | 22 |

Si consideramos, al igual que Block *et al.*, (2010) que el número de células presentes en el embrión es un factor condicionante sobre

la competencia, en este punto tampoco encontramos diferencias significativas entre la adición de PVP-40, BSA y FCS. Además el número de células presentes en los embriones no parece depender solo de las condiciones de cultivo de los embriones, si no también parece estar condicionado por las condiciones de desarrollo previas. En este sentido, Saggirkaya *et al.*, (2007) encontraron diferencias estadísticas en el número de células por blastocisto madurando los ovocitos en medio con tres suplementaciones distintas, aún cuando el medio de cultivo era el mismo. Por lo tanto podemos afirmar, al igual que Chung *et al.*, (2007), que es posible la sustitución de las fuentes tradicionales de proteína por una macromolécula sintética (PVP-40) para mantener tasas aceptables de desarrollo embrionario a partir de ovocitos bovinos madurados *in vitro*, y en concreto usando un medio simple de condiciones completamente definidas y en baja tensión de oxígeno. Sin embargo, hay que considerar que el porcentaje de blastocistos obtenido tiene un valor relativo en su capacidad para predecir la competencia para el desarrollo de los ovocitos, puesto que las alteraciones inducidas durante esta etapa pueden afectar al metabolismo celular o modificar la expresión de algunos genes, y estos efectos se manifestarán durante el desarrollo postimplantacional, neonatal e incluso durante la vida adulta (Lane y Gardner, 1997 y 2003; Duranthon y Renard, 2001). Por lo tanto son necesarios más ensayos para evaluar las tasas de apoptosis celular y la supervivencia embrionaria, así como realizar transferencia a receptoras para evaluar la fertilidad y posibles alteraciones en el desarrollo fetal ocasionado por la variación de estos factores en la MIV.

A la vista de los presentes resultados, podemos concluir que la utilización de un medio de maduración simple (SOF) suplementado con PVP, sin la presencia de proteínas de ori-



gen animal, y en condiciones de baja tensión de oxígeno, permite el desarrollo de los ovocitos bovinos, sin comprometer su posterior evolución hasta el estado de blastocisto.

## Bibliografía

- Ali A, Sirard MA, 2002. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biol. Reprod.* 66, 901-905.
- Batt PA, Gardner DK, Camero AW, 1991. Oxygen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* 3, 601-607.
- Bavister BD, Yanagimachi R, 1977. The Effects of Sperm Extracts and Energy Sources on the Motility and Acrosome Reaction of Hamster Spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 2, 228-237.
- Block J, Bonilla L, Hansen PJ, 2010. Efficacy of in vitro embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo cultured medium, *J. Dairy Sci* 93, 5234-5242.
- Camous S, Heyman Y, Méziou W, Menezo Y, 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fertil.* 72, 479-85.
- Castro e Paula LA, Hansen PJ, 2007. Interactions between oxygen tensión and glucose concentration that modulate actions of heat shock on bovine oocytes during in vitro maturation. *Theriogenology* 68, 763-770.
- Chung JT, Tosca L, Huang TH, Xu L, Niwa K, Chian RC, 2007. Effect of polyvinylpyrrolidone on bovine oocyte maturation in vitro and subsequent fertilization and embryonic development. *Reprod. Biomed. Online.* Aug;15(2):198-207. PubMed PMID: 17697497.
- Duranthon V, Renard JP, 2001. The development competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology* 55, 1277-1289.
- Eppig J.J, 1996. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 8:485-489.
- Gosden R, Byatt-Smith JG, 1986. Oxygen concentration gradient across the ovarian follicular epithelium: model, predictions and implications. *Hum. Reprod.* 1, 65-68.
- Gosden R, Krapez J, Briggs D, 1997. Growth and development of the mammalian oocyte. *Bioessays* 10, 875-882.
- Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Yamada M, Imai H y Kashima N, 2000. Low oxygen tensión during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. *Mol. Reprod. Dev.* 57, 353-360.
- Kruip TAM, Beverse MM, Kemp B, 2000. Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. *Theriogenology* 53, 611-618.
- Lane M, Gardner DK, 1997. EDTA stimulates the development of cleavage stage mouse embryos by inhibiting the glycolytic enzyme phosphoglycerate kinase. *Biol. Reprod.* 57, 193 abstr.
- Lane M, Gardner DK, 2003. Ammonium induces aberrant blastocyst diferentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol Reprod.* 69, 1109-1117.
- Lee DR, Lee JE, Yoon HS, Lee H, Kim MK, Roh S, 1997. The supplementation of culture medium with protease improves the hatching rate of mouse embryos *Human Reproduction* vol. 12 no. 11 pp. 2493-2498.
- Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, First NL, 1986. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocytes complexes. *Biol Reprod* 35:850-857.
- Lim KT, Lee BC, Kang SK, Hwang WS, 2003. Effects of protein source and energy substrates on the in vitro development of bovine embryos in a two-step culture system. *J. Vet. Sci.* 4 (1), 73-78.
- 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. *Mol. Reprod. Dev.* 37, 48-53.
- McKiernan SH, Bavister BD, 1992. Different lots of bovine serum albumin inhibit or stimulate in vitro development of hamster embryos. *In Vitro Cell Dev Biol* 28, 154-156.
- Mingoti GZ, Caiado Castro VS, Méo SC, Barretto LS, Garcia JM, 2009. The effect of interaction between macromolecule supplement and oxygen tension on bovine oocytes and embryos cultured in vitro. *Zygote*. 17(4), 321-328.
- Moor RM, Mattioli M, Ding J, Nagai T, 1990. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil.* 40, 197-210.
- Motlik J, Fulk J, 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology* 25, 87-96.
- Nakao H, Nakatsuji N, 1990. Effects of co-culture, medium components and gas phase on in vitro fertilized bovine embryos. *Theriogenology* 33, 591-600.
- Ocana-Quero JM, Pinedo-Merlin M, Moreno-Millan M, 1999. Influence of follicle size, medium, temperature and time on the incidence of diploid bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 51 (3), 667-672.
- Orsi NM, Leese HJ, 2004. Amino acid metabolism of preimplantation bovine embryos cultured with bovine serum albumin or polyvinyl alcohol. *Theriogenology* 61, 561-572.
- Oyamada T, Fukui Y, 2004. Oxygen tension and medium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *J.Reprod. Dev.* 50, 107-117.
- Pursel VG, Wall RJ, Rexroad Jr CE, Hammer RE, Brinster RL, 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology* 24, 687-691.
- Redding GP, Bronlund JE, Hart AL, 2006. The effects of IVF aspiration on the temperature, dissolved oxygen levels, and pH of follicular fluid. *J. Assis. Reprod. Genet.* 23, 37-40.
- Robertson I, Nelson RE, 1998. Certificación y identificación de embriones. En: Stringfellow DA y Seidel SM (Eds.). *Manual de la International Embryo Transfer Society*. IETS, Savoy, IL, USA, pp. 109-122.
- Rose TA, Bavister BD, 1992. Effect of oocyte maturation medium in vitro development of in vitro fertilized bovine embryos. *Mol Reprod Dev.* 31, 72-77.
- 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. *Anim. Reprod. Sci.* 101, 225-240.
- Takahashi Y, First NL, 1992. In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37, 963-978.
- Thibault C, Szollosi D, Gerard M, 1987. Mammalian oocytes maturation. *Reprod. Nat. Dev.* 27, 865-896.
- Van de Leemput EE, Vos PL, Zeinstra EC, Bevers MM, van derWeijden GC, Dieleman SJ, 1999. Improved in vitro embryo development using in vivo matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. *Theriogenology* 52, 335-349.
- Watson AJ, De Sousa P, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquhart J, Westhusin ME, 2000. Impact of bovine maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biol. Reprod.* 62, 355-364.

(Aceptado para publicación el 6 de julio de 2012)