



NOTA CORTA [SHORT NOTE]

FERTILIZACION DE OVOCITOS CAPRINOS MADURADOS EN DOS MEDIOS DE CULTIVO

[FERTILIZATION OF GOAT OOCYTES MATURATED IN TWO CULTURE MEDIA]

A. Soberano-Martínez<sup>1</sup>, A. Bravo-Patiño<sup>1</sup>, I. Olivo-Zepeda<sup>1</sup>, I. Toscano-Torres<sup>1</sup>, M. Cajero-Juárez\*<sup>2</sup>, J. Herrera-Camacho<sup>2</sup>, M. C. Navarro-Maldonado<sup>3</sup>, J. C. Segura-Correa<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Posta Zootecnia. Km 9.5 Carr. Morelia-Zinapequaro. Col. El Trébol. Tarímbaro, Michoacán, México CP 58880. <sup>3</sup>Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa, Av San Rafael Atlixco No.186, Col.Vicentina C.P.09340 Del. Iztapalapa México D.F.

<sup>4</sup>Campus Ciencias Biológicas y Agropecuarias-Universidad Autónoma de Yucatán. Km 15.5 Carr. Mérida-X'matkuil. CP 97100, Mérida, Yucatán.

Email: cajeromarco@hotmail.com

\*Corresponding Author

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de dos medios de cultivo en la tasa de maduración y fertilización de ovocitos de cabra. Los complejos cumulus ovocito (CCO's) fueron obtenidos de ovarios de cabras post-mortem. En el experimento I (EXP I), 361 CCO's fueron divididos al azar para su maduración en TCM-199 (n=171) y HECM-9 (n=190). Ambos medios fueron suplementados con LH y FSH (10µg/ml) y 50µg/ml de gentamicina. Los CCO's fueron cultivados a 38.5 °C, 5% CO<sub>2</sub> y a las 27 h post-maduración, fueron lavados en PBS y teñidos con Hoescht 33342 para evaluar la tasa de maduración. En el experimento II (EXP II) 667 CCO's fueron distribuidos en TCM-199 (n=323) y HECM-9 (n=344), y 30 ovocitos de cada tratamiento fueron evaluados como en el EXP I, el resto fueron co-incubados con 2x10<sup>4</sup> espermatozoides caprinos en medio TBM + 0.03% de BSA para evaluar la tasa de fertilización a las 36 h después. En el EXP I, la tasa de maduración nuclear fue superior (p<0.05) en HECM-9 (60.5%), respecto al TCM-199 (38.6%). En el EXP II, la tasa de maduración *in vitro* (MIV) y de fertilización *in vitro* (FIV) fue superior (p<0.05) en el medio HECM-9 (84.8% y 19.18%, respectivamente) que en TCM-199 (62.7% y 9.59%, respectivamente). El HECM-9 mejora la maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de cabra.

**Palabras clave:** cabras; HECM-9; maduración *in vitro*; producción *in vitro*.

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the effect of two culture media on the *in vitro* maturation (IVM) and fertilization (IVF) rates of goat oocytes. Cumulus oocyte complexes (COC's) were obtained from ovaries of postmortem goats. In experiment I (EXP I), 361 COC's were randomly distributed for maturation in TCM-199 (n=171) and HECM-9 (n=190) media. Both media were supplemented with LH and FSH (10µg/ml) and 50µg/ml gentamicin. COC's were cultivated at 38.5 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Twenty-seven hours post-maturation, the COC's were washed in PBS and stained with Hoescht 33342 to evaluate the nuclear maturation. In experiment II (EXP II) 667 COC's were distributed in TCM-199 (n=323) and HECM-9 (n=344), and 30 oocytes of each treatment were evaluated as in EXP I, the rest were co-incubated with 2x10<sup>4</sup> buck spermatozoa in TBM medium + 0.03% BSA to evaluate the fertilization rate after 36 h. In EXP I, the nuclear maturation rate was higher (p<0.05) in HECM-9 (60.5%), respect to TCM-199 (38.6%). *In vitro* maturation (IVM) and *in vitro* fertilization (IVF) rates in the EXP II were higher (p<0.05) in the HECM-9 (84.8% and 19.18%, respectively) than in TCM-199 media (62.7% and 9.59%, respectively). The HECM-9 is able to support the *in vitro* maturation and fertilization of goat oocytes.

**Key words:** goat; HECM-9; *in vitro* maturation; *in vitro* production.

## INTRODUCCIÓN

En pequeños rumiantes, la producción de embriones *in vitro* muestra gran variabilidad debido a que los componentes de los medios utilizados son limitados si se comparan con los del fluido uterino o bien por la falta de sustratos adecuados para la síntesis de nuevos compuestos (Korhonen *et al.*, 2005; Kharche *et al.*, 2009).

Los protocolos estándar para la producción de embriones *in vitro* (PIV), precisan de la exposición de los ovocitos y embriones a tres diferentes medios durante cada una de las fases, que incluyen la maduración (MIV), fertilización (FIV) y desarrollo *in vitro* de los embriones (DIV) (Yoshioka *et al.*, 2008). Se desconoce el efecto de transferir el embrión en desarrollo a los diferentes medios; no obstante, es posible que el embrión realice cambios en su metabolismo para soportar cambios en la osmolaridad, pH y aprovechamiento eficiente de los sustratos necesarios para su desarrollo (Yoshioka *et al.*, 2008).

El medio TCM-199 (Tissue Culture Medium), originalmente diseñado para satisfacer necesidades de células somáticas en prolongados períodos de cultivo (Herradón *et al.*, 2007), se utiliza en forma frecuente, solo o suplementado con diferentes sustancias como suero fetal o albúmina sérica bovina (BSA) y algunas hormonas (Kharche *et al.*, 2009), en la producción de embriones *in vitro*; no obstante, se demostró que contiene algunos componentes que bloquean o inhiben el desarrollo embrionario temprano (Bavister *et al.*, 1992). Alternativamente, se desarrollaron medios libres de proteínas y químicamente definidos como el fluido oviductal sintético y el medio de cultivo para embriones de hámsteres -6 y 9 (HECM-6 y 9). El HECM, se diseñó para evaluar efectos de compuestos contenidos en el medio y evitar confusión con factores componentes del suero (Bavister, 1995). Los medios HECM-6 y 9 se utilizaron para el cultivo de embriones (85.2%) en bovinos (Krisher *et al.*, 1999) y maduración *in vitro* (65%) en ovinos (Navarro *et al.*, 2006), pero no existe información en la especie caprina; por lo tanto el objetivo del estudio fue evaluar el efecto del medio químicamente definido HECM-9 sobre la tasa de maduración y fertilización de ovocitos de cabra.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Ovocitos.** Los ovocitos fueron obtenidos de ovarios de cabras sacrificadas en un rastro comercial y mantenidos en solución salina al 0.9% (38.5 °C) suplementada con gentamicina (50µg/ml) y se transportaron al laboratorio del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología Molecular (CMEB) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ubicado en el Km. 9 de la

Carretera Morelia-Zinapécuaro, en el municipio de Tarímbaro, Michoacán en menos de 2 h post-sacrificio. Los folículos de 2-6 mm de diámetro fueron aspirados con una aguja hipodérmica calibre 18 y el líquido folicular fue depositado en un tubo cónico con medio TCM-199 suplementado con sales Earl's, 26.9mM NaHCO<sub>3</sub> (Gibco), suplementado con 25mM de Hepes, 0.001g/ml de polivinil alcohol (PVA) y 100UI/ml de heparina, se mantuvo en reposo por 15min, el precipitado se depositó en cajas de Petri estériles para realizar la clasificación de los complejos cumulus ovocitos (CCO's), de acuerdo con las características morfológicas del citoplasma y de las capas celulares del cúmulo descritas por Ward *et al.* (2000).

### Experimento I

**Maduración in vitro:** Un total de 361 CCO's fueron lavados 3 a 4 veces en TCM-199, sin heparina, y fueron asignados de manera aleatoria a dos medios para su maduración: **TCM-199** (n=171 ovocitos suplementado con 275µg/ml de piruvato de sodio, 146µg/ml de L-glutamina 10% (v/v) suero fetal bovino (Gibco), 1µg/ml de 17 β-estradiol; **HECM-9** (n=190 ovocitos) elaborado con base en BM3 (McKiernan y Bavister, 2000), 100 µl de un stock de 11 aminoácidos no esenciales (ácido glutámico 0.01mM, asparagina 0.01mM, cisteína 0.01mM, glicina 0.01mM, histidina 0.01mM, lisina 0.01mM, prolina 0.01mM, serina 0.01mM, ácido aspártico 0.01mM; glutamina 0.20mM y taurina 0.50mM), y suplementado con 10µL 3.02mM de pantotenato en solución salina, 10µg/ml de factor de crecimiento epidermal (EGF) y 0.1mg/ml de PVA. Ambos medios fueron suplementados con 10µg/ml de LH, FSH, y 50µg/ml de gentamicina.

Los CCO's fueron depositados en grupos de 10, en cajas estériles de maduración de cuatro pozos en un volumen de 500µl del medio TCM-199 o HECM-9 (pH 7.4), previamente equilibrado por 24 h a 38.5 °C, y se incubaron por 27 h, a 38.5 °C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, fueron desnudados con hialuronidasa al 0.01%, lavados en PBS y teñidos con Hoescht 33342 (1% en PBS) para evaluar la tasa de maduración nuclear mediante la extrusión del primer cuerpo polar (metafase II), siguiendo el protocolo descrito por Velilla *et al.* (2002).

### Experimento II

**Maduración in vitro:** 727 CCO's fueron distribuidos en los medios de maduración TCM-199 (n=323) y HECM-9 (n=344), como se describe en el EXP I, excepto que en el EXP II se realizó la desnudación y tinción con Hoescht 33342 en 30 ovocitos de cada tratamiento para evaluar la tasa de maduración, el resto de los CCO's continuaron en el proceso de FIV.

**Fertilización in vitro.** Después de la MIV, grupos de 10 CCO's de ambos medios fueron lavados, por separado, tres veces en medio TBM (medio amortiguador Tris) y transferidos a cajas estériles de cuatro pozos en gotas de 100µl de TBM suplementado con 0.3% de BSA, pre-equilibrado por 24 h a 38.5 °C. El semen fue obtenido de un macho cabrío mediante la técnica de vagina artificial. Una vez que el semen fue evaluado macro (color, olor y volumen) y microscópicamente (movilidad masal, movilidad progresiva, concentración, viabilidad y morfología espermática), se diluyó 1:3 v/v en medio mDM (Younis *et al.*, 1991), se centrifugó (2min a 100g) en dos ocasiones. Al final se repuso igual volumen de medio del sobrenadante retirado (swim-up); posteriormente se incubó, para su capacitación, en volumen 1:6 v/v durante 45 min a 37° C en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>. Inmediatamente después, una muestra de 500µl del sobrenadante fue obtenida y diluida en 1.5ml de medio mDM suplementado con 100µg/ml de heparina durante 15 min. Aproximadamente 2x10<sup>4</sup> espermatozoides fueron co-incubados con los CCO's en el medio TBM + 0.3% de BSA durante 24 h a 38.5°C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y humedad saturada.

A las 24 h de iniciado el proceso de FIV, los CCO's de cada medio de maduración, fueron desnudados con hialuronidasa al 0.1%, lavados en el medio de TBM + 0.3% de BSA y colocados de manera independiente en 450µl del mismo medio. Los ovocitos fueron

observados y evaluados 12 h después y aquellos con dos o más blastómeros fueron considerados como fertilizados.

### Análisis estadístico

Los datos de la tasa de maduración y fertilización fueron analizados mediante la prueba de chi-cuadrada, utilizando el procedimiento NPAR1WAY del programa estadístico SAS (2000).

## RESULTADOS

### Experimento I

La tasa de maduración nuclear (Figura 1), fue superior ( $p < 0.05$ ) en los ovocitos mantenidos en HECM-9 (60.5%), respecto al TCM-199 (38.6%).

### Experimento II

La tasa maduración nuclear (Figura 2) fue superior ( $p < 0.05$ ) en el medio HECM-9 (84.8%) que en TCM-199 (62.7%), mientras que la tasa de fertilización *in vitro* en el medio TBM + 0.03% de BSA (Figura 2) de los ovocitos madurados HECM-9 fue superior ( $p > 0.05$ ) que en el TCM-199 (19.18% vs 9.59%, respectivamente).

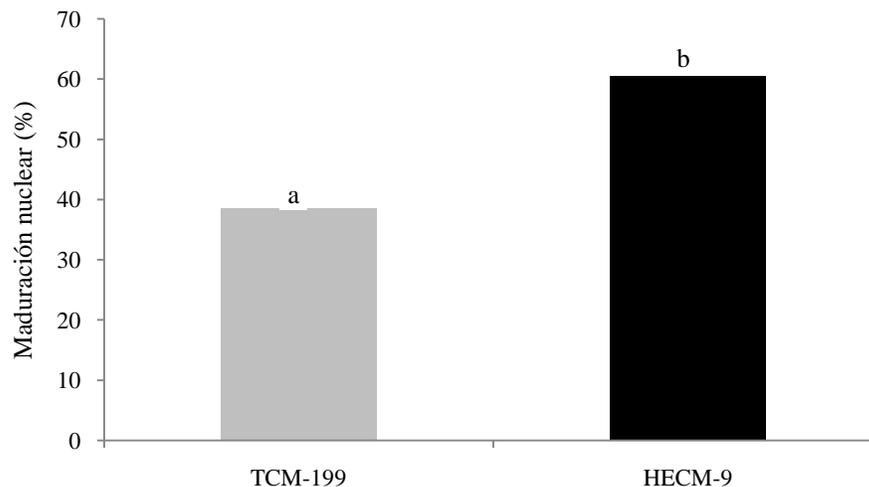


Figura 1. Tasa de maduración *in vitro* de ovocitos caprinos en medio TCM-199 y HECM-9. <sup>ab</sup> Indica diferencias entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

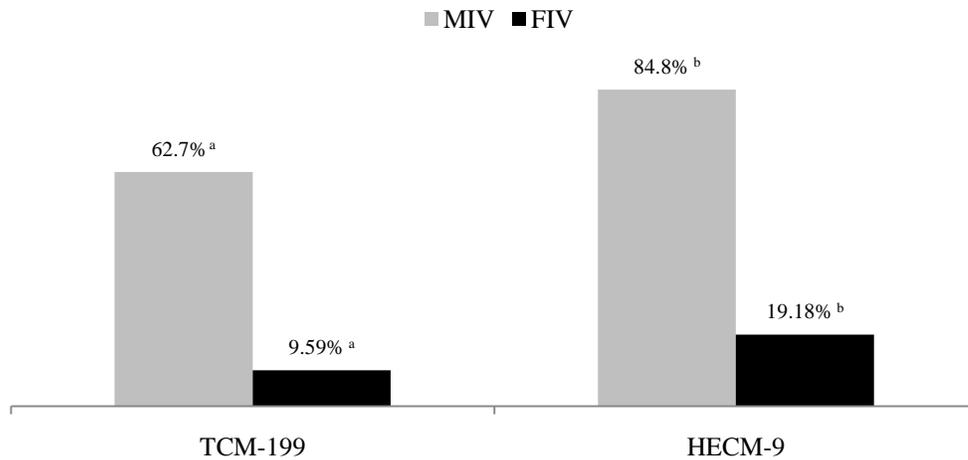


Figura 2. Tasa de maduración (MIV) y fertilización *in vitro* (FIV) de ovocitos de cabra en medio TCM-199 y HECM-9. <sup>ab</sup> Indican diferencias entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

Los resultados de la maduración *in vitro* en medio HECM-9 o TCM-199 en el EXP I (60.5 vs 38.6%, respectivamente) y EXP II (84.8% vs 62.7%, respectivamente) del presente estudio, difieren con los reportados por Navarro *et al.* (2006) quienes, en ovinos, no encontraron diferencias en la tasa de maduración cuando los ovocitos fueron mantenidos en medio HECM-9 (65.0%) o TCM-199 (71.0%). En el mismo sentido, Robledo *et al.* (2009), no encontraron efectos en la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos ovinos cuando fueron mantenidos en el medio HECM-9 (73.3%) con respecto al TCM-199 (71.4%). Estos resultados sugieren que el medio HECM-9, puede aportar elementos necesarios para que el ovocito de cabra y de oveja, completen su maduración nuclear lo que pudiera favorecer la posterior tasa de fertilización.

Algunos estudios (Zheng *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2004) han dejado de manifiesto que la adición de compuestos específicos como los aminoácidos no esenciales, el factor de crecimiento epidérmico y el pantotenato, al HECM-9, desempeñan en conjunto un papel fundamental en el proceso de maduración y desarrollo embrionario, como ha sido demostrado previamente en otras especies (Devreker *et al.*, 2001; Jeong y Yang, 2001; Zheng *et al.*, 2002), no obstante que fue un medio diseñado para la maduración y desarrollo embrionario de hámster (Bavister, 1995).

*In vivo*, los aminoácidos no esenciales se encuentran presentes en altas concentraciones en fluidos del oviducto y algunos como glicina, alanina, taurina y cisteína se detectan en concentraciones variables en el tracto reproductivo de mamíferos (Miller y Schultz, 1987; Zheng *et al.*, 2002; Hong y Lee, 2007).

En estudios *in vitro*, se ha observado que la adición de aminoácidos no esenciales en el medio de maduración de porcinos (Hong *et al.*, 2004) y bovinos (Lim *et al.*, 1999; Naurollah y Chian, 2005), promueve la maduración citoplasmática del ovocito, favoreciendo la penetración del espermatozoide y el subsecuente desarrollo de los embriones hasta la etapa de blastocito.

Estudios en monos (Zheng *et al.*, 2002), demostraron que la adición de aminoácidos no esenciales en el medio básico modificado 5 (mBM5), estimularon un mayor ( $p < 0.05$ ) potencial de maduración de los ovocitos ( $66.0\% \pm 19.0\%$ ), en comparación con los tratamientos sin aminoácidos esenciales mBM5 (37.3%) y mBM5+Glutamina (48.3%) y los medios donde se incluyeron aminoácidos esenciales mBM5 + 11 AA (41%), mBM5 + EA (41%). El papel que desempeñan los aminoácidos no esenciales en la producción de embriones *in vitro*, no es del todo claro, pero es posible que favorezcan la síntesis de proteínas, participen en la regulación del pH intracelular y la osmoregulación, así como quelatores de metales pesados y señales celulares (Van Winkle, 2001; Hong y Lee, 2007). La acumulación de estos aminoácidos en el ovocito es usada en eventos meióticos, síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y producción de energía; eventos esenciales en la maduración de los ovocitos, debido a que los mayores cambios que ocurren durante su maduración, están relacionados con la fosforilación de proteínas y con la activación del factor promotor de la maduración, la asimilación e incorporación de aminoácidos debe ocurrir antes de la etapa de mórula (Naurollah y Chian 2005; Rahman *et al.*, 2008).

Por otra parte, la inclusión del factor de crecimiento epidérmico (EGF; epidermal growth factor) en el medio de maduración HECM-9, podría influenciar la

tasa de maduración y el desarrollo embrionario, ya que se ha demostrado, que en ovocitos de cabra, la expresión de receptores de EGF desencadenan señales a través de las vías proteínas activadoras de las cinasas mitogénicas -MAPK (Gall *et al.*, 2005).

Estudios previos han demostrado que la adición de 20ng/ml de EGF en el medio de cultivo de ovocitos caprinos promovió una mayor expansión de las células del *cumulus oophorus* (52.25%) y alto porcentaje (64.51%) de maduración nuclear (Nagar y Purohit, 2005). Es posible que la adición del EGF en el medio de maduración modifique la síntesis de proteínas durante el proceso de maduración *in vitro* de los ovocitos, posiblemente por un incremento en la actividad de las histonas y en las proteínas cinasas mitógenas durante los estadios tempranos de la maduración *in vitro* (Purohit *et al.*, 2005).

La adición del ácido pantoténico en el medio de maduración HECM-9, puede favorecer la maduración citoplasmática de los ovocitos de cabra y el subsecuente desarrollo embrionario, como consecuencia de un incremento en la producción de ATP y de glutamato, precursor del glutatión, en el ciclo de Krebs (Bormann *et al.*, 2003). Se ha demostrado que el incremento en la síntesis del glutatión durante la maduración de ovocitos de vacas (Luvoni *et al.*, 1996) y cerdos (Abeydeera *et al.*, 1998) incrementan el desarrollo y viabilidad de blastocitos, ya que ejerce un papel fundamental en la defensa de radicales libres de oxígeno que adelantan el proceso de apoptosis (McKiernan y Bavister, 2000).

En cuanto a la tasa de fertilización *in vitro*, se observó una mayor respuesta en los ovocitos madurados en HECM-9 (19.8%), respecto a los mantenidos en TCM-199 (9.59%). Es preciso señalar que el medio TBM (Tris Buffered Medium), utilizado en el presente estudio como un medio de fertilización, tradicionalmente se utiliza en la FIV de la especie porcina (Coy *et al.*, 2002); mientras que los medios TALP (Tyrode's Albumine Lactate Piruvate médium) o el SOF (Synthetic Oviductal Fluid), de uso en rumiantes y utilizados en este laboratorio, no mostraron resultados consistentes, por lo que se decidió utilizar el TBM para evaluar el efecto de la maduración en HECM-9 y del TCM-199 sobre la tasa de FIV.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, difieren de lo reportado por Jiménez *et al.* (2006), quienes observaron una tasa de fertilización de ovocitos de cabras prepúberes madurados en TCM-199 y fertilizados en medio SOF de 26.6%. Otros autores (Coy *et al.*, 2002), reportaron una tasa de FIV de ovocitos porcinos de 26.26% en medio TBM y madurados en medio NCSU-37 (North Caroline State University-37 médium), porcentaje superior al

observado en el presente trabajo tanto en el medio HECM-9 como TCM-199.

Por otra parte, Nagar y Purohit (2005), observaron una tasa de fertilización de ovocitos de cabra madurados y fertilizados en TCM-199 de 9.3%, lo que coincide con lo observado en el presente trabajo, encontrando además que la adición creciente de EGF incremento significativamente la tasa de FIV. Los resultados obtenidos por estos autores sugieren que el TCM-199, por sí solo no es adecuado para soportar el proceso de FIV y que requiere de sustancias adicionales como el EGF que faciliten el proceso de la fecundación.

Aunque el efecto del cambio de medios en las etapas de la producción de embriones *in vitro*, se desconoce, algunos autores (Krisher *et al.*, 2007; Yoshioka *et al.*, 2008; Magalhães *et al.*, 2010), señalaron que si bien el ovocito puede modificar su metabolismo para ajustar el pH, la osmolaridad del medio y aprovechamiento de sustratos, también es posible que se reduzca la capacidad de interacción con el espermatozoide, afectando la tasa de FIV y el desarrollo embrionario posterior (Yoshioka *et al.*, 2008). El cambio de medios entre una etapa y otra de la PIV, puede ejercer un efecto estresante sobre el ovocito, que puede desencadenar mecanismos de respuesta a corto plazo destinados a preservar la homeostasis, si esto no es posible, el embrión provoca cambios en la morfología y reducción en la proliferación celular, pudiendo llegar hasta la apoptosis; a mediano y largo plazo, el efecto del estrés embrionario puede provocar bajas tasas de preñez, un elevado riesgo de aborto, presencia de anomalías congénitas y muerte posnatal (Feugang *et al.*, 2009).

En conclusión, los resultados obtenidos del presente estudio demuestran que el HECM-9 puede ser utilizado en los procesos de maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos en la especie caprina, no obstante, se precisan estudios adicionales que permitan reforzar los hallazgos encontrados en el presente trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por CIC-UMSNH, Landsteiner Scientific y CONACYT. Alejandra Soberano Martínez recibió una beca del CONACYT (43120/43120).

## REFERENCIAS

Abeydeera, L.R., Wang W.H., Cantley T.C., Rieke A., Day B.N. 1998. Coculture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after *in vitro* fertilization: relevance to intracellular glutathione. *Biology of Reproduction*. 58: 213-218.

- Bavister, B., Rose-Hellekant, T.A., Pinyopummintr, T. 1992. Development of *in vitro* matured *in vitro* fertilized Bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*. 37: 127-146.
- Bavister, B.D. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reproduction Update*. 1: 91-148.
- Bormann, L.C., Onger, ME, Krisher LR. 2003. The effect of vitamins during maturation of caprine oocytes on subsequent developmental potential *in vitro*. *Theriogenology*. 59:1373-1380.
- Coy, P., Gadea, J., Romar, R., Matás, C., García, E. 2002. Effect of *in vitro* fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening and *in vitro* development in pigs. *Reproduction*. 124: 279-288.
- Devreker, F., Hardy, K., Van den Bergh, M., Vannin, A.S., Emiliani, S., Englert, Y. 2001. Amino acids promote human blastocyst development *in vitro*. *Human Reproduction*. 16: 749-756.
- Feugang, M.J., Camargo, R.O., Memili, E. 2009. Culture systems for bovine embryos. *Livestock Science*. 121: 141-149.
- Gall, L., Boulesteix, C., Ruffini, S., Germain, G. 2005. EGF-induced EGF-receptor and MAP Kinase phosphorylation in goats cumulus cells during *in vitro* maturation. *Molecular Reproduction and Development*. 71: 489-94.
- Herradón, P.G., Quintela, L.A., Becerra, J.J., Ruibal, S., Fernández, M. 2007. Fecundación *in vitro*: Alternativa para la mejora en bovinos. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 15: 38-41 (Suppl. 1).
- Hong, J., Lee, E. 2007. Intrafollicular amino acid concentration and the effect of amino acids in a defined maturation medium on porcine oocyte maturation, fertilization, and preimplantation development. *Theriogenology*. 68: 728-735.
- Hong, J.Y., Yong, H.Y., Lee, B.C., Hwang, W.S., Lim, J.M., Lee, E.S. 2004. Effects of amino acids on maturation, fertilization and embryo development of pig follicular oocytes in two IVM media. *Theriogenology*. 62: 1473-1482.
- Jeong, B.S., Yang, X. 2001 Cysteine, glutathione, and percoll treatments improve porcine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*. 59: 330-335.
- Jiménez, M.A.R., Anguita, B., Izquierdo, D., Mogas, T., Paramio, M.T. 2006. Embryo development of prepubertal goat oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) according to oocyte diameter. *Theriogenology*. 66: 1065-1072.
- Kharche, S.D., Goel, A.K., Jindal, S.K., Yadav, E.N., Yadav, P., Sinha, R., Sinha, N.K. 2009. Effect of serum albumin supplementation on *in vitro* capacitation and fertilization of caprine oocytes. *Small Ruminant Research*. 81: 85-89.
- Krisher, R.L., Brad, A.M., Herrick, J.R., Sparman, M.L., Swain, J.E. 2007. A comparative analysis of metabolism and viability in porcine oocytes during *in vitro* maturation. *Animal Reproduction Science*. 98:72-96.
- Korhonen, K., Matomäki, J., Ketoja, E., Kananen, K., Halmekytö, B., Rätty, M., Peippo, J. 2005. The effect of *in vitro* maturation medium on cryosurvival, cell numbers and apoptotic indexes of bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*. 17: 293 (Abstract 286).
- Krisher, R.L., Lane, M., Bavister, B.D. 1999. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biology of Reproduction*. 60: 1345-1352.
- Lim, J.M., Lee, B.C., Lee, E.S., Chung, H.M., Ko, J.J., Park, S.E., Cha, K.Y., Hwang, W.S. 1999. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes cultured in a chemically defined, protein-free medium: effects of carbohydrates and amino acids. *Reproduction Fertility and Development*. 11: 127-132.
- Luvoni, G.C., Keskinetepe, L., Brackett, B.G. 1996. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing culture media. *Molecular Reproduction and Development*. 43: 437-443.
- Magalhães, D.M., Fernandes, D.D., Mororó, M.B.S., Silva, C.M.G., Rodriguez, G.Q., Bruno, J.B., Matos, M.H.T., Campello, C.C., Figueiredo, J.R. Effect of the medium replacement interval on the viability, growth and *in vivo* maturation of isolated caprine and ovine pre-antral follicles. *Reproduction in Domestic*

- Animals. doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01607.x
- McKiernan, S.H., Bavister, B.D., 2000. Culture of one-cell hamster embryos with water soluble vitamins: pantothenate stimulates blastocyst production. *Human Reproduction*. 15: 157-164.
- Miller, J.G., Schultz, G.A. 1987. Amino acid content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract. *Biology of Reproduction*. 34: 125-129.
- Nagar, D., Purohit, N.G. 2005. Effect of epidermal growth factor on maturation and fertilization *in vitro* of goat follicular oocytes in a serum free or serum supplemented medium. *Veterinarski Arhiv*. 75: 459-467.
- Naurollah, R., Chian Ri-Cheng. 2005. Effects of amino acids on *in vitro* maturation, fertilization and development of immature bovine oocytes. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 3: 36-41.
- Navarro, M.C., Ducolomb, R.Y., Galindo, R.A., Rosado, G. 2006. Sheep oocytes matured in a simplex medium (HECM-1), an answer to *in vitro* fertilization. *Reproduction, Fertility and Development*. 18: 275-276.
- Purohit, G.N., Brady, M.S., Sharma, S.S. 2005. Influence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complexes in serum free media and their subsequent development *in vitro*. *Animal Reproduction Science*. 87: 229-239.
- Rahman, A.N.M.A., Abdullah, R.B., Wan-Khadijah, W.E. 2008. *In vitro* maturation of oocytes special reference to goat: A Review. *Biotechnology*. 7: 599-611.
- Robledo, V.J.M., Herrera, C.J., Cajero, J.M., Navarro, M.M.C., García, V.A. 2009. Evaluación de dos medios de maduración *in vitro* para la producción de embriones ovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 10: 95-99.
- SAS. 2000. Institute Inc. SAS/STAT User's Guide. Version 8. Cary, NC, SAS Institute Inc.
- Van Winkle, L.J. 2001. Amino acid transport regulation and early embryo development. *Biology of Reproduction*. 64: 1-12.
- Velilla, E., López-Béjar, M., Rodríguez-González, E., Vidal, F., Paramio, M.T. 2002. Effect of Hoechst 33342 staining on developmental competence of prepubertal goat oocytes. *Zygote*. 10: 201-208.
- Ward, F.A., Lonergan, P., Enright, B.P., Boland, M.P. 2000. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovum pick-up technology. *Theriogenology*. 54: 433-446.
- Yoshioka, K., Suzuki, C., Onishi, A. 2008. Defined system for *in vitro* production of porcine embryos using single basic medium. *Journal of Reproduction and Development*. 54: 208-213.
- Younis, A.I., Zuelke, K.A., Harper, K.M., Oliveira, M.A.I., Brackett, B.G. 1991. *In vitro* fertilization of goats oocytes. *Biology of Reproduction*. 44: 1177-1182.
- Zheng, P., Bavister, B.D., Ji, W.J. 2002. Amino acid requirements for maturation of rhesus monkey (*Macacca mulatta*) oocytes in culture. *Reproduction*. 124: 515-522.

Submitted July 08, 2010 – Accepted September 24, 2010  
Revised received September 28, 2010