



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Ciencias Veterinarias

**Nuevas estrategias para mejorar la eficiencia del semen
sexado en producción in vitro de embriones bovinos**

Luis Ferré, MSc

Tesis presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias Veterinarias

Director:

Dr. Pablo Ross, DVM, MSc, PhD

Assistant Professor

Department of Animal Science

University of California, Davis

One Shields Avenue

Davis, California

USA

Co-Director:

Dr. Hugo Ortega, DVM, PhD

Profesor Asociado

Cátedra de Biología Celular

Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad Nacional del Litoral

Esperanza, Santa Fe

Argentina

2017



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Ciencias Veterinarias

Nuevas estrategias para mejorar la eficiencia del semen sexado en producción in vitro de embriones bovinos

Luis Ferré, MSc

Tesis presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias Veterinarias

Director: Dr. Pablo Ross, DVM, MSc, PhD	UCDavis	Davis, California, USA
Co-Director: Dr. Hugo Ortega, DVM, PhD	FCV, UNL	Esperanza, Santa Fe, Argentina

2017

Miembros del Tribunal de Tesis

Dr. Julián Bartolomé, DMV, MSc, PhD	FCV, UNLPam	General Pico, La Pampa, Argentina
Dr. Marcelo Miragaya, DVM, MSc, PhD	FCV, UBA	CABA, Argentina
Dr. Pablo Marini, DVM, PhD	FCV, UNR	Casilda, Santa Fe, Argentina

PUBLICACIONES

Ferré L B, Bogliotti Y, Chitwood J L, Fresno C, Ortega H H, Kjelland M E, Ross P J. 2016. Comparison of different fertilisation media for an in vitro maturation–fertilisation–culture system using flow-cytometrically sorted X chromosome-bearing spermatozoa for bovine embryo production. *Reproduction, Fertility and Development* 28: 1695-1703.

Ferré L B, Bogliotti Y, Chitwood J L, Fresno C, Ortega H H, Kjelland M E, Ross P J. 2017. Effect of spermatozoa motility hyperactivation factors and gamete coincubation duration on in vitro bovine embryo development using flow cytometrically sorted spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development* 29: 805-814.

Ferré L B, Chitwood J L, Fresno C, Ortega H H, Kjelland M E, Ross P J. 2017. Effect of different mini-volume colloid centrifugation configurations on flow cytometrically sorted sperm recovery efficiency and quality using a computer-assisted semen analyzer. *Reproduction in Domestic Animals* 00: 1-8.

*Dedicada a mi esposa Mariana y mis hijos Ignacio y
Martina, a mis Padres Bernardo y Silvia, y a mi
Hermano Juan José. A ellos les agradezco su permanente
apoyo y aliento.*

AGRADECIMIENTOS

Varios agradecimientos importantes deseo realizar, el primero es para el INTA al cual agradezco enormemente por avalar mi doctorado y apoyarme desde el inicio. A los miembros del AIPA, a la Coordinación del AIPA, a Miguel Taverna, la Dirección de la EEA Rafaela y Centro Regional, les agradezco la oportunidad dispensada y su voluntad de promover la capacitación continua de sus técnicos.

A la Facultad de Veterinaria, UNL, y sus autoridades, en particular José Luis Peralta y Humberto Oochi y miembros de la Cátedra de Teriogenología, por brindarnos el espacio e infraestructura para instalar el Laboratorio. También les agradezco les haberme permitido realizar el doctorado en vuestra institución.

A Hugo Ortega por su excelente y desinteresada predisposición a ayudarme para poner en marcha el Laboratorio. A todo el equipo del Grupo "Ortega" les agradezco toda la ayuda recibida en especial para Marcelo Zayas, Pablo Díaz, y los demás integrantes del grupo por toda la colaboración prestada.

A mi director Pablo Ross a quien agradezco el haberme abierto las puertas de su Laboratorio, todo el apoyo brindado para realizar los experimentos y al tiempo dedicado durante mi estadía en UCDavis. Gracias por la oportunidad y permanente apoyo brindado, pero más aún por ser un excelente mentor.

A todo el equipo del Laboratorio de UCDavis, en especial a James Chitwood y Yanina Bogliotti por toda la ayuda y compañerismo que me brindaron.

El último es para mi sponsor oficial: MI FAMILIA. A mis Padres por haberme brindado las mejores oportunidades de estudio. Gracias a todo el esfuerzo y sacrificio hecho por ustedes pude encarar todas las etapas de estudio, Facultad, Maestría y ahora, el Doctorado. A mi esposa Mariana y mis hijos Ignacio y Martina por bancarme y acompañarme en todo este tiempo. Por su permanente aliento y apoyo, GRACIAS.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	11
RESUMEN.....	14
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUCCIÓN.....	16
1.1. Producción <i>in vitro</i> de embriones.....	16
1.1.1. Generalidades: Utilización y eficiencia de la PIVE.....	16
1.1.2. Obtención de los ovocitos.....	21
1.1.2.1. Colecta de ovocitos de ovarios de matadero.....	21
1.1.3. Competencia del ovocito.....	28
1.1.4. Factores que afectan la calidad del ovocito.....	31
1.2. Maduración <i>in vitro</i> de los ovocitos.....	37
1.2.1. Factor promotor de la maduración.....	48
1.2.2. Medio de IVM y suplementos.....	49
1.2.3. Tensión de oxígeno durante IVM, FIV y IVC.....	55
1.3. Fecundación <i>in vitro</i> (FIV).....	56
1.3.1. El espermatozoide.....	67
1.3.2. Capacitación del espermatozoide.....	71
1.3.3. Hiperactivación.....	73
1.3.4. Sexado de semen.....	77
1.4. Cultivo <i>in vitro</i> embrionario.....	86
1.4.1. Metabolismo embrionario.....	103
1.5. Deficiencias del sistema PIVE.....	109
2. OBJETIVOS.....	125
2.1. Hipótesis General.....	125
2.2. Objetivos General.....	126
2.3. Objetivos Particulares.....	126
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	126
3.1. ESTUDIO 1: <i>Comparación de diferentes medios de fecundación en un sistema de producción in vitro de embriones bovinos con semen sexado</i>	126
3.1.1. <i>Origen de los materiales químicos</i>	126
3.1.2. <i>Recuperación de ovocitos y maduración in vitro (IVM)</i>	126

3.1.3.	<i>Fecundación in vitro (FIV)</i>	127
3.1.4.	<i>Cultivo de embriones in vitro (IVC)</i>	127
3.1.5.	<i>Determinación de la masa celular interna (ICM) y número de células trofoblásticas (CT) en blastocitos</i>	128
3.1.6.	<i>Diseño experimental</i>	128
3.1.7.	<i>Análisis estadístico</i>	129
3.2.	<i>ESTUDIO 2: Efecto de factores hiperactivadores de la motilidad espermática y duración de la co-incubación de gametas sobre el desarrollo de embriones bovinos producidos in vitro utilizando semen sexado</i>	130
3.2.1.	<i>Origen de los materiales químicos</i>	130
3.2.2.	<i>Recuperación de ovocitos y maduración in vitro (IVM)</i>	130
3.2.3.	<i>Fecundación in vitro (FIV)</i>	131
3.2.4.	<i>Evaluación del estatus nuclear de los presuntos cigotos</i>	131
3.2.5.	<i>Cultivo de embriones (IVC)</i>	132
3.2.6.	<i>Diseño experimental</i>	132
3.2.7.	<i>Análisis estadístico</i>	134
3.3.	<i>ESTUDIO 3: Efecto de diferentes configuraciones de mini-coloides de densidad en la eficiencia de recuperación y calidad de espermatozoides sexados utilizando un analizador de semen computarizado</i>	135
3.3.1.	<i>Origen de los materiales químicos</i>	135
3.3.2.	<i>Muestras de semen sexado</i>	135
3.3.3.	<i>Descongelamiento de las pajuelas y procesamiento de los espermatozoides</i>	135
3.3.4.	<i>Análisis de la motilidad espermática asistido por computadora (CASA)</i>	137
3.3.5.	<i>Diseño Experimental</i>	137
3.3.6.	<i>Análisis Estadístico</i>	138
4.	RESULTADOS	139
4.1.	<i>ESTUDIO 1: Comparación de diferentes medios de fecundación en un sistema de producción in vitro de embriones bovinos con semen sexado</i>	139
4.2.	<i>ESTUDIO 2: Efecto de factores hiperactivadores de la motilidad espermática y duración de la co-incubación de gametas sobre el desarrollo de embriones bovinos producidos in vitro utilizando semen sexado</i>	142
4.3.	<i>ESTUDIO 3: Efecto de diferentes configuraciones de mini-coloides de densidad en la eficiencia de recuperación y calidad de espermatozoides sexados utilizando un analizador de semen computarizado</i>	145
5.	DISCUSIÓN	152
5.1.	<i>ESTUDIO 1: Comparación de diferentes medios de fecundación en un sistema de producción in vitro de embriones bovinos con semen sexado</i>	152

5.2.	ESTUDIO 2: <i>Efecto de factores hiperactivadores de la motilidad espermática y duración de la co-incubación de gametas sobre el desarrollo de embriones bovinos producidos in vitro utilizando semen sexado</i>	156
5.3.	ESTUDIO 3: <i>Efecto de diferentes configuraciones de mini-coloides de densidad en la eficiencia de recuperación y calidad de espermatozoides sexados utilizando un analizador de semen computarizado</i>	161
6.	CONCLUSIONES.....	164
6.1.	ESTUDIO 1: <i>Comparación de diferentes medios de fecundación en un sistema de producción in vitro de embriones bovinos con semen sexado</i>	164
6.2.	ESTUDIO 2: <i>Efecto de factores hiperactivadores de la motilidad espermática y duración de la co-incubación de gametas sobre el desarrollo de embriones bovinos producidos in vitro utilizando semen sexado</i>	164
6.3.	ESTUDIO 3: <i>Efecto de diferentes configuraciones de mini-coloides de densidad en la eficiencia de recuperación y calidad de espermatozoides sexados utilizando un analizador de semen computarizado</i>	165
7.	CONCLUSIONES GENERALES.....	165
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	166

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Efecto de la aspiración folicular sobre la tasa de recuperación y calidad de los ovocitos de ovarios Holando provenientes del matadero (Wang y col., 2007)	23
Tabla 2: Efecto de la aspiración folicular sobre la tasa de clivaje y desarrollo embrionario de ovocitos recuperados de ovarios Holando de matadero (Wang y col., 2007)	24
Tabla 3: Número y calidad ovocitos por ovario obtenidos por aspiración manual con jeringa o por corte de folículos "slicing" (Carolan y col., 1994)	25
Tabla 4: Productividad entre ovocitos obtenidos por aspiración manual con jeringa o por corte de folículos "slicing" (Carolan y col., 1994)	25
Tabla 5: Medios FIV. Principales diferencias.....	63
Tabla 6: Evolución del clivaje y desarrollo embrionario bajo distintos sistemas de producción y origen de los ovocitos fertilizados con semen sexado.....	83
Tabla 7: Diferencias entre embriones bovinos producidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> (Greve y col., 1993, Leibo y Loskutoff, 1993, Pollard y Leibo, 1993, Pollard y Leibo, 1994, Farin y col., 1995, Massip y col., 1995, Wright y Ellington, 1995, Van Soom y col., 1997a, Van Soom y col., 1997b, Holm y Callesen, 1998, Abe y col., 1999a, Boni y col., 1999, Khurana y Niemann, 2000b, Crosier y col., 2001, Holm y col., 2002, Rizos y col., 2002a, Rizos y col., 2002c, Ushijima y col., 2008, McHughes y col., 2009)	96
Tabla 8: Cultivo en grupo de embriones. Potenciales ventajas y desventajas (Reed y col., 2011)	100
Tabla 9: Consecuencias de la maduración, fertilización de ovocitos bovinos y el desarrollo temprano del embrión <i>in vitro</i> versus <i>in vivo</i> . Implicancias en la producción y calidad de los blastocistos (Rizos y col., 2002c).....	114
Tabla 10: Transferencias de embriones PIVE (frescos y congelados) bovinos registrados por la International Embryo Transfer Society a nivel mundial (IETS, http://www.iets.org/comm_data.asp)	123
Tabla 11: Componentes de los medios de fecundación <i>in vitro</i> (en mM, a menos que se indique lo contrario).....	129
Tabla 12: Componentes de los medios de fecundación <i>in vitro</i> M199-FERT y SOF-FERT (en mM, caso contrario se indican las unidades).....	133
Tabla 13: Valor p del test de verosimilitud para efectos lineales para los predictores seleccionados.....	139
Tabla 14: Producción de embriones luego de la fecundación con semen sexado hembra.	140
Tabla 15: Conteo de células MCI y CT en el día 7 de blastocistos obtenidos con diferentes medios de fertilización.	141
Tabla 16: Efecto de los factores de hiperactivación de la motilidad espermática sobre el clivaje, desarrollo embrionario, calidad embrionaria y capacidad de eclosión luego de la fecundación de ovocitos con semen sexado.	143
Tabla 17: Efecto de los hiperactivadores de la motilidad espermática sobre la tasa de polispermia luego de la fecundación de ovocitos con semen sexado.	143
Tabla 18: Efecto del tiempo de co-incubación y medio de fecundación sobre el desarrollo embrionario luego de la fecundación de ovocitos con semen sexado.	143
Tabla 19: Efecto de la duración de la co-incubación de ovocitos y espermatozoides, y medio de fecundación sobre la tasa de polispermia luego de la fecundación con semen sexado.....	144
Tabla 20: Velocidad promedio de trayectoria (VAP), velocidad en línea recta (VSL) y velocidad curvilínea (VCL) fueron determinadas utilizando un analizador espermático asistido por computadora Hamilton-Thorne IVOS luego que el semen sexado fuera centrifugado a través de una mono-capa de densidad continua o doble-capa de densidad discontinua de PureSperm® o sin centrifugación (sin tratar).	148

Tabla 21: Desplazamiento lateral promedio de la cabeza (ALH) y frecuencia de cruce (BCF) fueron determinadas utilizando un analizador espermático asistido por computadora Hamilton-Thorne IVOS luego que el semen sexado fuera centrifugado a través de una mono-capa de densidad continua o doble-capa de densidad discontinua de PureSperm® o sin centrifugación (sin tratar). 149

Tabla 22: Motilidad espermática en línea recta (STR) y motilidad espermática lineal (LIN) fueron determinadas utilizando un analizador espermático asistido por computadora Hamilton-Thorne IVOS luego que el semen sexado fuera centrifugado a través de una mono-capa de densidad continua o doble-capa de densidad discontinua de PureSperm® o sin centrifugación (sin tratar). 150

Tabla 23: Motilidad (MOT) y motilidad progresiva (PMOT) fueron determinadas utilizando un analizador espermático asistido por computadora Hamilton-Thorne IVOS luego que el semen sexado fuera centrifugado a través de una mono-capa de densidad continua o doble-capa de densidad discontinua de PureSperm® o sin centrifugación (sin tratar). 151

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Evolución de los embriones bovinos producidos *in vitro* e *in vivo* registrados por la International Embryo Transfer Society a nivel mundial (IETS, http://www.iets.org/comm_data.asp) 17

Figura 2: Esquema de producción *in vitro* de embriones (PIVE) bovinos (Palma, 2008) 18

Figura 3: Representación simplificada de la foliculogénesis y crecimiento del ovocito en mamíferos (Collado-Fernandez y col., 2012) 20

Figura 4: Eficiencia en la recuperación de COCs mediante aspiración manual con jeringa, slicing y la combinación de ambas (Zarcula y col., 2012) 23

Figura 5: Ondas foliculares y fases de desarrollo de ovocitos en bovinos. El eje X indica días después de la ovulación (Ginther y col., 1997, Ginther y col., 2001). 29

Figura 6: (A) Dibujo esquemático del crecimiento de ovocitos bovinos. (AA) Folículo primordial con el ovocito rodeado por una sola capa de células de granulosa aplanadas. (AB) Folículo primario con el ovocito rodeado por una sola capa de células de granulosa cuboidal. (AC) Folículo secundario con el ovocito rodeado por más de una capa de células de granulosa cuboidales. (AD) Folículo terciario temprano. (AE y AF) Folículo Folículos. (B) Dibujo esquemático de aspectos ultraestructurales de la pre-maduración del ovocito bovino en el folículo dominante hasta el pico de LH y maduración después del pico. (BA) Ovocito de un folículo dominante 6 días antes del pico de LH. La ultraestructura general es idéntica a la obtenida al final del crecimiento del ovocito (AF). (BB) Ovocito de un folículo dominante 3 días antes del pico de LH. (BC) Ovocito de un folículo dominante el día antes del pico de LH. (BD) Ovocito en "ruptura de la vesícula germinal" de un folículo ovulatorio a las 9-12 h después del pico de LH. (BE) Ovocito en MI en un folículo ovulatorio a las 15 h después del pico de LH. (BF) Ovocito en MII en un folículo ovulatorio aproximadamente 24 h después del pico de LH (Hytel, 2011). 30

Figura 7: Diagrama de un folículo ovárico preovulatorio de ovario que muestra los múltiples tipos de células implicadas en el mantenimiento del medioambiente folicular y determina la competencia del ovocito. Abreviaturas: A= andrógenos; AMPc= AMP cíclico; E2= estrógeno; OSF= factores secretados por el ovocito; P4= progesterona (Krisner, 2013)..... 38

Figura 8: Estadíos de maduración nuclear en ovocitos bovinos (Mayes, 2002) y momento de la meiosis que se encuentra cada estadío (Sirard y col., 1989). 41

Figura 9: La técnica de swim-up. El semen descongelado es cuidadosamente depositado en la parte inferior del tubo que contiene el medio de lavado. El tubo se coloca en un ángulo de 45° y se incuba durante 60 minutos a temperatura controlada. Los espermatozoides viables nadan hacia el medio de lavado del cual se los aspira (Beydola y col., 2013) 66

Figura 10: Centrifugación por gradiente de densidad. Los gradientes inferior (80-90%) y superior (40-45%) son cuidadosamente constituidos en capas. El tubo es centrifugado a una velocidad alta (aproximadamente 2000-2500 rpm) durante 10-15 minutos. El sobrenadante es descartado y el pellet obtenido es nuevamente centrifugado a una velocidad baja (1200 rpm). Los espermatozoides muertos, anormales, medio de congelación es retenido en las capas superiores. Los espermatozoides motiles se ubican en la parte inferior del gradiente (Beydola y col., 2013)..... 66

Figura 11: Características generales del espermatozoide mamífero (Eddy, 2006, Toshimori y Eddy, 2015) 69

Figura 12: Patrón de movimiento del flagelo espermático regular, curvas simétricas y trayectoria lineal (A) e hiperactivado (B) (Suarez, 2008)..... 74

Figura 13: Separación de espermatozoides portadores de cromosomas X e Y por citometría de flujo (Johnson y Welch, 1999)..... 79

Figura 14: Origen de los ovocitos en los diferentes sistemas de producción de embriones. Ovum pick-up (OPU = área del rectángulo pequeño); PIVE con ovocitos de matadero (Slaughterhouse= área del rectángulo grande); superovulación y colecta de embriones convencional (MOET = área en el óvalo); folículo pre-ovulatorio (POF). Los folículos con ovocitos en color blanco no son atrésicos; mientras que los de color gris muestran atresia temprana y los de color negro son atrésicos (Merton y col., 2003) 110

Figura 15: Porcentaje de éxito en cada etapa de PIVE (Lonergan y col., 2001, Sirard y col., 2006, Lonergan y Fair, 2008, Lonergan y Fair, 2014)..... 112

Figura 16: Imágenes representativas de blastocistos fecundados con semen sexado hembra en diferentes medios de fecundación. Fila superior: Imágenes de campo brillante de blastocistos (objetivo 20X) mostrando la diferencia en la calidad de los BLs producidos. Fila inferior: Imágenes representativas de blastocistos teñidos para MCI (anti-SOX2) y CT (anti-CDX2), ADN (Hoechst). Estos marcadores se utilizaron para determinar el número total de células en blastocistos y el número de células asignadas a MCI y CT (objetivo 40X)..... 141

Figura 17: Tasa de recuperación para semen sexado luego de la centrifugación a través de diferentes capas de densidad de PureSperm®. Los boxplot de la tasa de recuperación bruta son presentados para los seis tratamientos de configuración de capas de densidad testeados y agrupados por el número de capas en gráficos A y B, respectivamente. Media del modelo ajustada ± estimación del error estándar son presentados en los gráficos C y D para las mismas configuraciones de los gráficos A y B, respectivamente. Los resultados del test de mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) están representados con letras (Bonferroni ajustado $P < 0,05$). 146

Figura 18: Tasa de viabilidad para semen sexado luego de la centrifugación a través de diferentes capas de densidad de PureSperm®. Boxplots de la tasa de viabilidad bruta de los seis tratamientos de configuración de capas de densidad testeados y agrupados por el número de capas en gráficos A y B, respectivamente. Media del modelo ajustada ± estimación del error estándar son presentados en los gráficos C y D para las mismas configuraciones de los gráficos A y B, respectivamente. Los resultados del test de mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) están representados con letras (Bonferroni ajustado $P < 0,05$). 147

ABREVIATURAS UTILIZADAS

Ácido Ribonucleico mensajero
 Albúmina sérica bovina

ARNm
 BSA

Aspiración por vía laparoscópica (Laparoscopic Ovum Pick-Up)	LOPU
Benzoato de estradiol	BE
Células trofoblásticas	CT
Complejos ovocito-cumulus	OOCs
Congelamiento de Embriones	CE
Contenido intracelular de glutatión	GSH
Cuerpo lúteo	CL
Cultivo <i>in vitro</i>	IVC
Especies reactivas al oxígeno	ROS
Estrés calórico o térmico	EC
Factor de crecimiento epidérmico	EGF
Factor promotor de la maduración	FPM
Fecundación <i>in vitro</i>	FIV
Fluido oviductal sintético	SOF
Gonadotropina coriónica equina	eCG
Hormona folículo estimulante	FSH
Hormona liberadora de gonadotropinas	GnRH
Hormona luteinizante	LH
Índice de rendimiento total genómico	GTPI
Inseminación artificial	IA
International Embryo Transfer Society	IETS
Maduración <i>in vitro</i>	IVM
Masa celular interna (o disco embrionario)	MCI
Metafase II	MII
Monofosfato de adenosina cíclico	AMPc
Penicilamina, hipotaurina y epinefrina	PHE
Producción <i>In vitro</i> de Embriones	PIVE
Progesterona	P4
Prostaglandina	PGF
Punción o Aspiración Folicular Guiada por Ultrasonografía	OPU
Ruptura de la vesícula germinal	GVBD
Selección genómica	SG
Semen sexado	SS

Superovulación y Colecta de Embriones Convencional
Terneros con sobrepeso ("large offspring syndrome")
Tissue culture medium-199
Transferencia de Embriones
Tyrode's albumin lactate pyruvate medium
Vesícula germinal
Zona pellucida

MOET
LOS
TCM-199
TE
TALP
VG
ZP

RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue el de optimizar el uso de semen sexado en embriones bovinos producidos *in vitro* (PIVE). Para ello se realizaron tres estudios con el fin de evaluar: diferentes medios de fecundación *in vitro* (FIV): M199-FERT, fluido oviductal sintético (SOF-FERT) y Tirodes-albúmina-lactato-piruvato (TALP) (Estudio 1); agentes hiperactivadores de la motilidad espermática y tiempos de fecundación (Estudio 2) y mini-coloides de densidad variable (Estudio 3). En el Estudio 1, complejos ovocito-cumulus (COCs) fueron fecundados con semen sexado. Se analizó el clivaje, polispermia, formación de blastocitos, calidad embrionaria y capacidad de eclosionar. Los resultados mostraron que el medio de fecundación afectó la tasa de clivaje, desarrollo embrionario, calidad y capacidad de eclosión. En el Estudio 2, factores hiperactivadores de la motilidad: cafeína (CA), teofilina (TH) y CA + TH fueron testados al igual que la duración de la fecundación (8 hs versus 18 hs). Los factores hiperactivadores de la motilidad afectaron las tasas de clivaje y desarrollo embrionario, mientras que el acortamiento de la fecundación no afectó la producción embrionaria. Finalmente, en el Estudio 3 se analizaron diferentes mini-coloides de densidad continuos y discontinuos. La tasa de recuperación y viabilidad espermática y la calidad seminal se vio afectada por el tipo de mini-coloides de densidad. La mono-capa de densidad continua al 80% y el medio SOF-FERT combinado con CA + TH resultaron ser la mejor combinación para obtener la mayor tasa de recuperación, viabilidad y calidad espermática, tasa de clivaje, desarrollo embrionario, calidad embrionaria y capacidad de eclosión.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to optimize the use of sexed semen in bovine *in vitro*-derived embryos (PIVE). For this purpose, three studies were carried out to evaluate: different fertilization media, namely M199, synthetic oviductal fluid (SOF) and Tyrode's albumin-lactate-pyruvate (TALP), (Study 1); sperm motility hyperactivating factors and fertilization length (Study 2) and mini-colloids density layers (Study 3). In Study 1, oocyte-cumulus complexes (COCs) were fertilized with sexed semen. Cleavage, polyspermy, blastocyst formation, embryo quality and hatching ability were analyzed. The results showed that the fertilization medium affected cleavage rate, embryo development, embryo quality and hatching. In Study 2, motility hyperactivating factors: caffeine (CA), theophylline (TH) and CA + TH were tested along with oocyte-sperm coincubation time (8 h versus 18 h). The motility hyperactivating factors affected cleavage and embryo development

rates, whereas shortening the fertilization length did not affect embryo production performance. Finally, different continuous and discontinuous density mini-colloids were analyzed in Study 3. Sperm recovery, viability and semen quality were affected by the type of mini-colloid density. The mini single-continuous 80% density layer and SOF-FERT medium combined with CA + TH resulted as the best combination to obtain the highest sperm recovery rate, viability and sperm quality, cleavage, embryo development, embryo quality and hatching rates.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Producción *in vitro* de embriones

1.1.1. Generalidades: Utilización y eficiencia de la PIVE

La población mundial hoy está estimada en 7000 millones y según los últimos estudios realizados por el United States Census Bureau, la misma crecería a razón de 1000 millones de habitantes cada 11 años. Esta situación demográfica pone de manifiesto la necesidad global por producir alimentos en cantidad y calidad. A esto se le suma la condición de producirlos de manera sustentable y en armonía con el medio ambiente. En este sentido, la ganadería podría realizar un importante aporte pero para ello debe contar con herramientas eficientes, que maximicen la productividad, el potencial biológico y genético de los animales a un ritmo mucho más rápido que lo alcanzado por la reproducción convencional/natural (Cunningham, 1999, Smidt y Niemann, 1999, Bulfield, 2000, Andrabi y Maxwell, 2007).

Ante este contexto, las asociaciones de criadores y productores ganaderos recurrieron a las herramientas disponibles para identificar a los mejores reproductores mediante programas de selección y mejora genética. Una vez identificados los animales “superiores” se requiere el inicio del proceso de multiplicación de esos individuos mediante técnicas reproductivas. Desde el punto de vista histórico, gracias a los conocimientos adquiridos principalmente en el área de control de la dinámica folicular, dominancia folicular y efectos de la hormona folículo estimulante (FSH) a nivel ovárico, se inician las primeras pruebas de superestimulación folicular y colecta de embriones. El primer ternero producto de la transferencia o trasplante de un embrión (TE) fue en 1951 (Willett y col., 1951). La tecnología alcanzó su apogeo en los años '70 cuando la industria ganadera comenzó a importar genética en forma de embriones de razas británicas en lugar de ganado en pie. Las principales ventajas que observaron los usuarios de la época era la disminución del costo al evitarse largas cuarentenas y mayores seguridades sanitarias. El desarrollo de una técnica práctica de colecta y transferencia de embriones no quirúrgica apta para ser utilizada en condiciones de campo fue el motivo principal de su adopción por parte de los ganaderos y profesionales (Elsden y col., 1976, Rowe y col., 1976, Greve y col., 1977, Baker y Jillella, 1978, Brand y col., 1978, Sreenan, 1978, Tervit y col., 1980). La posibilidad de maximizar la capacidad reproductiva tanto del macho como de la hembra despertó un gran interés ya que, sumado a la posibilidad de congelar los embriones resultantes de la colecta (Maurer, 1978, Polge y Willadsen, 1978, Leibo, 1984), permitió un rápido avance y progreso en

los núcleos genéticos de cabañas y establecimientos ganaderos. En la especie bovina, la estimulación supernumeraria de los folículos ováricos por medio de FSH permitiría obtener entre 4 a 7 embriones transferibles por donante colectada (Bó y Mapletoft, 2014, Hasler, 2014). Cabe destacar que el número de embriones transferibles por donante superovulada y colectada no se ha modificado de manera significativa en los últimos años. La tasa de ovocitos no fertilizados y la variabilidad de la respuesta superovulatoria serían los factores que más afectan a la eficiencia global del MOET (Hasler, 2003, Mapletoft y Hasler, 2005, Bó y Mapletoft, 2014). La cantidad de colectas y embriones transferibles derivados de MOET (o *in vivo*) parecería haberse estabilizado en los últimos años mientras que la producción de embriones *in vitro* mantiene una tasa de crecimiento promedio anual del 13% (Figura 1).

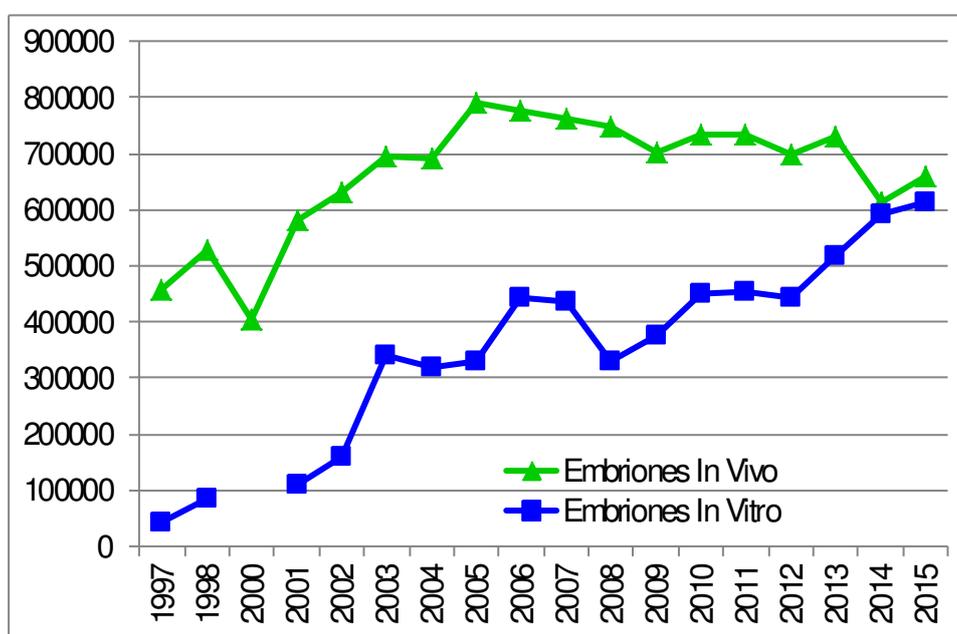


Figura 1: Evolución de los embriones bovinos producidos *in vitro* e *in vivo* registrados por la International Embryo Transfer Society a nivel mundial (IETS, http://www.iets.org/comm_data.asp)

De manera casi contemporánea a los trabajos en MOET se comenzó a estudiar los mecanismos, fisiología y comportamiento de las gametas *in vitro*. Así se iniciaron los primeros estudios produciendo embriones de ovocitos madurados y fecundados *in vitro* (Sreenan, 1970, Tervit y col., 1972a, Brackett, 1973, Iritani y Niwa, 1977, Kanagawa, 1979), a los cuales le siguieron publicaciones mostrando preñeces y nacimientos (Newcomb y col., 1978, Brackett y col., 1982, Lu y col., 1987, Xu y col., 1987, Goto y col., 1988, Fukuda y col., 1990). Estos logros promovieron el uso de PIVE utilizando ovarios colectados en el matadero o de vacas ovariectomizadas (ver Figura 2). De esta forma es factible extraer una gran cantidad de ovocitos

provenientes de hembras que han cumplido su ciclo productivo y generar embriones a bajo costo. Esta modalidad tuvo un auge importante con la llegada al mercado del semen sexado y la posibilidad de transferir embriones sexados en gran escala en los establecimientos lecheros comerciales (Gordon, 2003d, Hansen y Block, 2004, Hansen, 2006, Wilson y col., 2006, Xu y col., 2006, Xu y col., 2009).

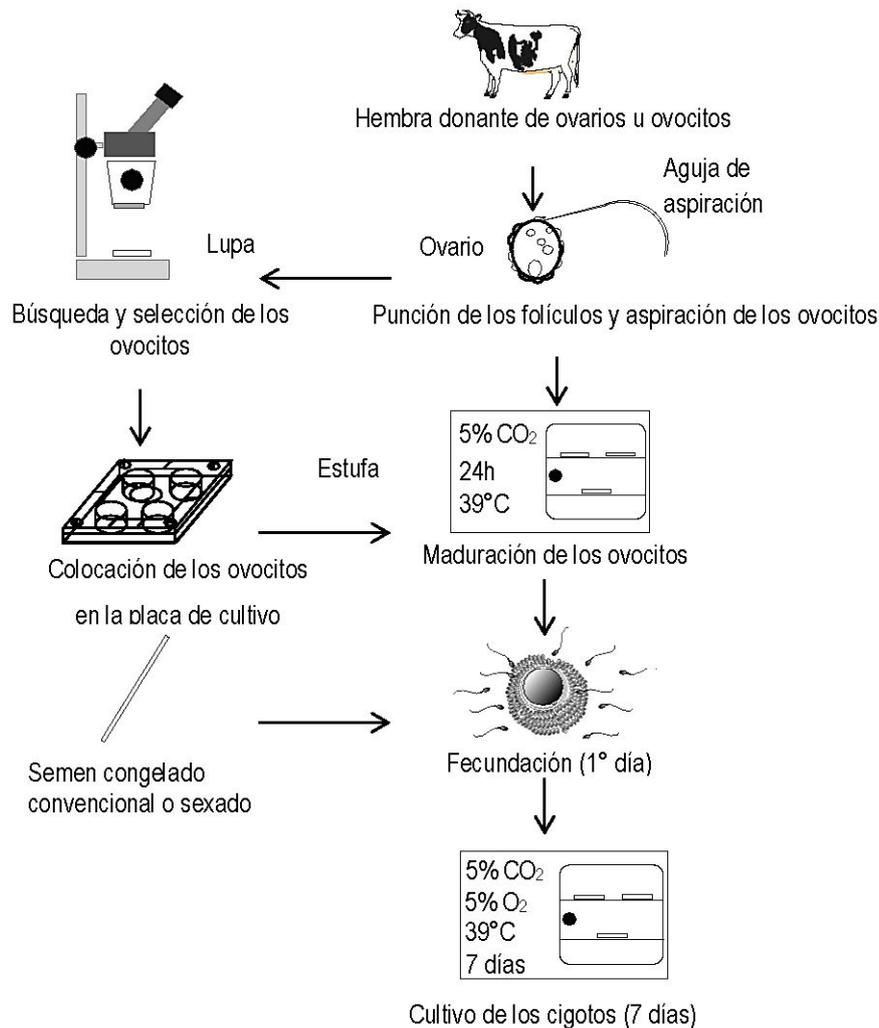


Figura 2: Esquema de producción *in vitro* de embriones (PIVE) bovinos (Palma, 2008)

Si bien esta modalidad sigue vigente, la recuperación de ovocitos de hembras vivas, copiando el sistema de recolección de ovocitos humanos en los centros de fertilidad asistida, otorgó a la técnica PIVE ventajas adicionales. Hacia fines de los '80 aparecen los primeros reportes de la técnica de aspiración folicular guiada por ultrasonografía (Callesen y col., 1987, Pieterse y col., 1988) y en poco tiempo comienza a extenderse su uso en centros genéticos. Este desarrollo de la técnica OPU vino de la mano de avances y progresos en el entendimiento de los procesos

básicos de las etapas de PIVE (Brackett, 1985, First y Parrish, 1987, Sirard y col., 1988, Leibfried-Rutledge y col., 1989, Gordon y Lu, 1990). La OPU comienza a mejorar su tasa de recuperación como consecuencia de la mejora en los equipos de ultrasonido y a un mayor entendimiento de los efectos de la presión de aspiración, el tamaño, diámetro de la aguja y circuito de colecta, entre otros, sobre la competencia del ovocito y el posterior impacto en el desarrollarlo embrionario (Kruip y col., 1991, Pieterse y col., 1991, Bols y col., 1996). En EE.UU. recién comienza a conocerse la técnica a nivel comercial hacia fines de los '90. Para ese entonces era utilizada principalmente para producir embriones de hembras "problemas" que por algún motivo no generaban embriones viables por la técnica de superestimulación, colecta y TE convencional (Galli y col., 2001). Por esta razón el desarrollo comercial de esta tecnología fue muy lento y recién tuvo su auge con la aparición del semen sexado (Johnson, 1995, Welch y Johnson, 1999).

Otra forma de ver o analizar la eficiencia de la técnica PIVE es a través de la capacidad de maximizar el uso de los ovocitos en cada ciclo estral o vida productiva de la donante. Los ovocitos de todas las hembras de mamíferos se forman durante el desarrollo fetal. Éstos se encuentran alojados en el interior de los folículos primordiales (de cientos a miles) y abastecerán las necesidades de toda la vida reproductiva del animal (Adams y Singh, 2014, Albertini, 2015). El número aproximado de folículos primordiales en la especie bovina es de >200.000 por ovario al nacimiento (Erickson, 1966b, Erickson, 1966a, Gordon, 2003a, Silva-Santos y col., 2011). Los folículos primordiales representan la unidad fundamental de desarrollo del ovario de los mamíferos. A lo largo del ciclo estral ocurren etapas sucesivas de crecimiento y regresión de folículos antrales que conducen al desarrollo de los folículos preovulatorios, constituyendo lo que denominamos dinámica folicular (Ginther y col., 1989, Lucy y col., 1992, Adams y col., 2008). A partir del nacimiento, de la reserva de los folículos primordiales se deriva el desarrollo o reclutamiento secuencial de grupos de folículos. El proceso de desarrollo de los folículos es de forma ininterrumpida y su duración es de aproximadamente 60 días. El folículo primordial es no gonadotropo-dependiente, y a medida que avanza en su crecimiento, se activan cambios estructurales y funcionales que lo convierte en folículo primario, folículo secundario o pre-antral, folículo terciario, cavitario o antral y finalmente folículo preovulatorio o de Graff (ver **Figura 3**) (Ginther y col., 1997, Aerts y Bols, 2010b, Aerts y Bols, 2010a).

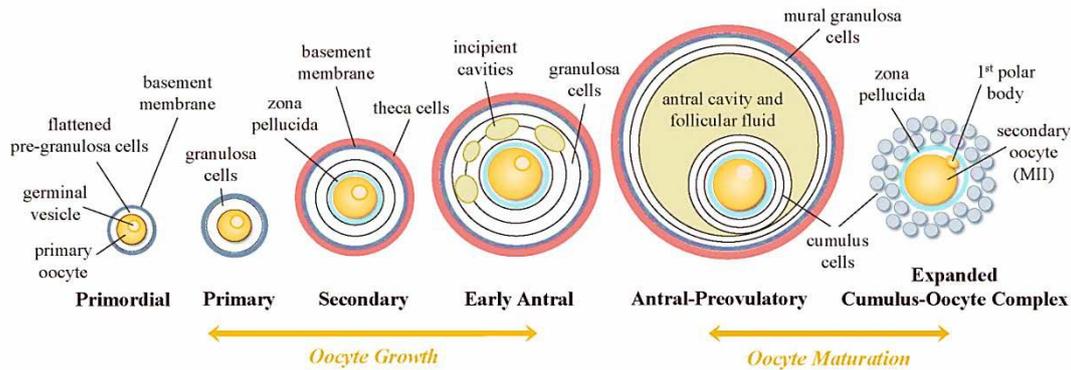


Figura 3: Representación simplificada de la foliculogénesis y crecimiento del ovocito en mamíferos (Collado-Fernandez y col., 2012)

Las etapas de fólculo primordial, primario y secundario, el crecimiento es no dependiente de las gonadotrofinas hipofisarias (FSH y LH), mientras que a partir de la formación de la cavidad antral el fólculo comienza a ser sensible a las gonadotrofinas para luego transformarse en dependiente (Orisaka y col., 2009). El proceso de desarrollo folicular se compone de tres fases o etapas: reclutamiento, selección y dominancia. Durante la fase de reclutamiento, una cohorte de fólculos comienza a crecer por la influencia de las gonadotrofinas, especialmente la FSH. El diámetro de los fólculos es de 4-5 mm y la cantidad de fólculos involucrados por ovario es de 5-6. A continuación, se produce la selección donde el fólculo más desarrollado bloquea el crecimiento de sus pares contemporáneos. Durante esta etapa el fólculo dominante continúa creciendo, mientras que los restantes fólculos sufren un proceso de atresia fisiológica. El fólculo dominante de la última onda folicular se transformará en el fólculo ovulatorio (Fortune y col., 1991, Webb y col., 1992, Adams, 1999, Driancourt, 2001, Fortune y col., 2001, Lucy, 2007a).

La eficiencia de multiplicar hembras preseleccionadas por mérito genético y/o calidad productiva es muy baja si consideramos la extensa reserva de fólculos primordiales en los ovarios de las hembras. Bajo un programa de multiplicación por servicio natural o inseminación artificial, la utilización del potencia genético de ese animal es extremadamente bajo. Si en cambio se utilizan técnicas reproductivas más avanzadas que incrementen la tasa de ovulación o reclutamiento de fólculos y si además, el procedimiento puede realizarse de manera repetida, la eficiencia se incrementa significativamente.

Si comparamos el desempeño productivo final entre la producción *in vivo* de embriones a través de la superovulación y colecta de embriones convencional y la producción *in vitro* de embriones

(PIVE), la cantidad de gestaciones totales y hembra por año sería superior cuando se utiliza OPU-PIVE (Pieterse y col., 1988, Kruij y col., 1991, Pieterse y col., 1991, Kruij y col., 1994). La posibilidad de producir un gran número de terneros con rasgos de producción conocida y acortar así el intervalo generacional en programas de cría fue avanzando y progresando principalmente de la mano de la selección genómica (SG). La SG aumentó aún más la presión de selección y la necesidad de multiplicar a una mayor velocidad a los animales con alto valor del índice de rendimiento total genómico (GTPI) (Goddard y Hayes, 2007, Hayes y col., 2009, Ponsart y col., 2013, Kasinathan y col., 2015). Esto trajo aparejado la necesidad de aspirar y producir embriones de terneras prepúberes para sacar provecho del resultado genómico logrado (Duby y col., 1996, Khatir y col., 1998b). Nuevamente la OPU-PIVE resultó ser la mejor alternativa para animales jóvenes en comparación con la TE clásica (Kasinathan y col., 2015).

Las proyecciones de la capacidad de producción por parte de PIVE en comparación con MOET marcan una diferencia de 3-4 veces a favor de PIVE. Si bien la productividad y plasticidad de PIVE no estaría mayormente objetada, la técnica presenta ciertos desafíos. Entre ellos, la baja congelabilidad de los embriones representa el mayor obstáculo de la técnica para lograr una mayor penetración en el mercado comercial tanto a nivel doméstico como en la comercialización de germoplasma a nivel internacional.

1.1.2. Obtención de los ovocitos

La recuperación de los ovocitos se puede realizar por aislamiento de los folículos, disección, aspiración por vacío (mediante jeringa o bomba), corte de los folículos ("slicing") o por lavado del oviducto (Gordon, 2003g, Wang y col., 2007). La elección de la técnica dependerá del objetivo que se persigue; es decir, si se requiere recuperar ovocitos pre o post-ovulación, de hembras faenadas o ganado en pie, colecta única de ovocitos o de manera repetida.

1.1.2.1. Colecta de ovocitos de ovarios de matadero

Los métodos para coleccionar ovocitos bovinos de folículos antrales de ovarios provenientes del matadero son la aspiración manual mediante jeringa y aguja hipodérmica y la aspiración con bomba de vacío (Fry y col., 1997). La técnica de slicing se utiliza en muchas ocasiones de manera complementaria a la aspiración manual con jeringa o por bomba de vacío con el objetivo de maximizar la eficiencia de recuperación sobre todo cuando los ovarios son escasos o

limitados, o cuando se trata de hembras valiosas (Takagi y col., 1992, Mantovani y col., 1999). Otros autores señalan que la combinación entre aspiración manual con jeringa y slicing no tendría beneficios adicionales aumentando proporcionalmente la recuperación de COCs (ver **Figura 4**) (Gordon, 2003g, Zarcula y col., 2012). En otros escenarios La eficiencia de recuperación del corte de los folículos o slicing sería del doble en comparación con la aspiración manual con jeringa o bomba de vacío (ver **Tabla 1**) (Vajta y col., 1996, Mantovani y col., 1999, Wang y col., 2007). Sin embargo, el rendimiento de la técnica dependería en gran medida de la destreza del operador, requiere de un tiempo operativo más prolongado y aumentaría el riesgo de una posible contaminación (Gordon, 2003g). El mayor número de ovocitos recuperados por el corte de los folículos se debe presumiblemente al hecho de que la técnica permite recuperar no solo los folículos visibles en la superficie del ovario si no también los alojados en la región cortical del ovario. Al combinar los folículos superficiales con los corticales se pueden lograr tasas de recuperación superiores a las otras metodologías de colecta de ovocitos (Arlotto y col., 1996). La aspiración de folículos de ovarios provenientes de matadero no ha sido tan estudiada como la aspiración folicular guiada por ecografía. En términos generales se ha privilegiado a la elección de una metodología rápida y eficiente para la aspiración de los ovarios y que minimice riesgos de contaminación y seguridad para el operador. La aspiración manual mediante jeringa (5-10 ml) y bomba de vacío calibrada para lograr un flujo de 12-15 ml/min han tenido gran aceptación entre los laboratorios de investigación y comerciales de PIVE (Fry y col., 1997, Besenfelder y col., 2000, Gordon, 2003g, Ulloa y col., 2015). En la especie bovina, usualmente se aspiran folículos entre 2 hasta 8 mm de diámetro utilizando agujas hipodérmicas descartables de 18 a 22 G conectadas a jeringas de 5 a 20 ml o bombas de vacío. Al igual que la aspiración guiada por ultrasonografía (OPU), el tamaño de la aguja, el diámetro y longitud del circuito y la presión de aspiración ejercen una gran influencia en la tasa de recuperación, calidad del ovocito y consecuencias posteriores durante el desarrollo *in vitro* (Carolan y col., 1994, Hashimoto y col., 1999, Besenfelder y col., 2000, Alm y col., 2008).

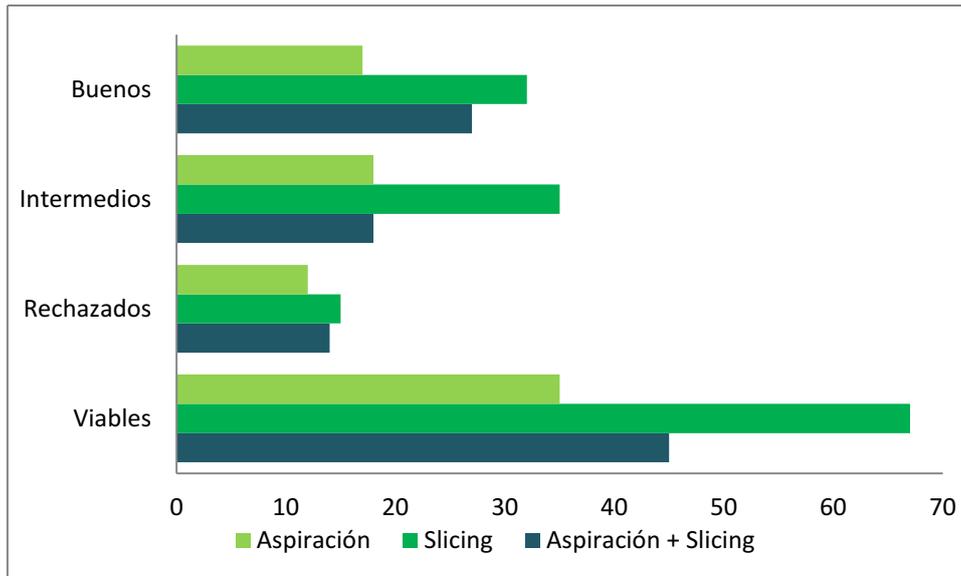


Figura 4: Eficiencia en la recuperación de COCs mediante aspiración manual con jeringa, slicing y la combinación de ambas (Zarcula y col., 2012)

Tabla 1: Efecto de la aspiración folicular sobre la tasa de recuperación y calidad de los ovocitos de ovarios Holando provenientes del matadero (Wang y col., 2007)

Método de aspiración	Total de ovocitos/ovario	Calidad de ovocitos/ovario			
		A	B	C	D
Corte de folículos ("slicing")	9,6 ^a ±0,4	4,2 ^a ±0,2	2,0±0,3	1,8±0,3	1,6±0,1
Punción sumergida	9,7 ^a ±0,4	4,6 ^a ±0,1	1,7±0,2	2,1±0,1	1,2±0,2
Aspiración manual con jeringa	5,8 ^b ±0,3	1,2 ^b ±0,2	2,4±0,1	1,0±0,1	1,1±0,2
Aspiración con bomba de vacío	5,6 ^b ±0,2	1,4 ^b ±0,2	2,1±0,1	1,5±0,3	0,5±0,1

Valores con letras diferentes en la misma columna difieren ($p < 0,05$)

La presión de vacío aplicada durante el proceso de aspiración de los folículos ováricos estaría en estrecha relación con el porcentaje de los ovocitos recuperados y su calidad (Kruip y col., 1994, Bols y col., 1995, Ward y col., 2000b). Ciertos autores señalan que generalmente se obtienen más ovocitos cuando la presión de vacío supera los 130 mmHg (Yuzpe y col., 1989, Pieterse y col., 1991, Bols y col., 1995, Bols y col., 1996), mientras que otros registran una disminución lineal en el porcentaje de los ovocitos obtenidos por encima de 30 mmHg (Ward y col., 2000b). Esto puede deberse al colapso del folículo alrededor de la aguja por la alta presión, evitando así el flujo o salida del líquido folicular y/o produciendo la retención del ovocito dentro del folículo. Durante la aspiración folicular, los ovocitos pueden sufrir daños por la presión de vacío, diámetro de la aguja, la longitud y diámetro de la conexión entre la aguja y el tubo, la posible turbulencia

generada, entre otros (Home y col., 1996, Hashimoto y col., 1998b, Gordon, 2003g, Bols, 2005, Rose, 2014). Una presión de aspiración por encima de 100 mmHg disminuiría la cantidad y calidad de ovocitos debido al daño mecánico provocado por la remoción de las células del cumulus y en consecuencia, un aumento de los ovocitos parcial o completamente desnudos (Kruip y col., 1994). La presión de vacío exacta en la punta de la aguja depende de la construcción del dispositivo de aspiración, la longitud y el diámetro del sistema de tubería, y el diámetro de la aguja (Fry y col., 1997, Besenfelder y col., 2000, Carter y col., 2002, Wang y col., 2007). Cabe aclarar que las condiciones óptimas para la recuperación de los ovocitos de ovarios de matadero no son necesariamente las mismas o aplicables para animales vivos y vice versa. Ciertos estudios comparativos sobre los efectos de la presión de aspiración y el diámetro de la aguja en relación a la eficiencia de recuperación de ovocitos de ovarios matadero resultó que para los ovarios de matadero, la tasa más alta de recuperación de ovocitos fue utilizando agujas 18 G y 40 mmHg de presión negativa de vacío (Hashimoto y col., 1998b, Hashimoto y col., 1999) mientras que para animales vivos se requeriría de agujas más grandes (17 G) y presión de vacío superiores (>55 mmHg) (Bols y col., 1996, Bols y col., 1997, Fry y col., 1997, Bols, 2005). Estos elementos deben ser tenidos en consideración ya que mantendrían una relación directa con la tasa de recuperación, calidad de los ovocitos obtenidos, competencia de desarrollo y producción de blastocistos (ver **Tabla 2**) (Vos y col., 1999, Ward y col., 2000b, Wang y col., 2007).

Tabla 2: Efecto de la aspiración folicular sobre la tasa de clivaje y desarrollo embrionario de ovocitos recuperados de ovarios Holando de matadero (Wang y col., 2007)

Método de aspiración	%Clivaje		%Blastocistos	
	A	B	A	B
Corte de folículos ("slicing")	77,8±3,4	70,1±3,1	27,8±4,6	21,6±2,4
Punción sumergida	74,2±3,1	71,8±2,8	25,1±1,5	23,8±2,2
Aspiración manual con jeringa	81,1±3,3	75,1±4,1	28,4±2,6	23,3±3,1
Aspiración con bomba de vacío	79,3±4,3	74,6±4,5	28,3±2,1	19,7±1,8

Otras comparaciones respecto a la aspiración manual con jeringa y corte de folículos ("slicing") mostraron que el slicing tomó tres veces más de tiempo por ovario en relación a la aspiración manual, pero su rendimiento fue tres veces superior (ver **Tabla 3** y **Tabla 4**) (Carolan y col., 1994). En términos de la eficiencia del trabajo de recuperación de ovocitos, el slicing provee la misma cantidad de ovocitos por unidad de tiempo que la aspiración manual, pero con muchos

menos ovarios (Carolan y col., 1994). Otros informaron que el número de ovocitos recuperados y el número de blastocistos obtenidos fue aproximadamente el doble en slicing en comparación con la aspiración (Vajta y col., 1996, Mantovani y col., 1999). Los métodos de extracción de ovocitos de los ovarios bovinos (disección, aspiración y slicing) pueden verse afectados por destreza del operador. Si bien la habilidad del operador no tuvo efecto significativo en la calidad de los ovocitos recuperados, los aspiradores calificados recuperaron más ovocitos en un lapso de 10 minutos en comparación con los principiantes (5,0 vs. 3,5), respectivamente (Mantovani y col., 1999). Otro factor a tener en cuenta es la condición fisiológica de la donante (preñada o vacía) y su condición corporal. Una mayor cantidad de COCs y de mejor calidad se colectarían de hembras con buena condición corporal y preñadas (Fazio y col., 1999).

Tabla 3: Número y calidad ovocitos por ovario obtenidos por aspiración manual con jeringa o por corte de folículos "slicing" (Carolan y col., 1994)

Método de aspiración	Calidad de ovocitos/ovario						Total
	A	B	C	D	E	F	
Aspiración manual con jeringa	4.3 ^a	2.5 ^a	1.7 ^a	3.1 ^a	1.4 ^a	0.7	13.9 ^a
Corte de folículos ("slicing")	17.1 ^b	3.1 ^b	7.5 ^b	5.1 ^b	9.8 ^b	1.7	44.2 ^b

Valores con letras diferentes en la misma columna difieren ($p < 0,05$)

Tabla 4: Productividad entre ovocitos obtenidos por aspiración manual con jeringa o por corte de folículos "slicing" (Carolan y col., 1994)

Método de aspiración	% Clivaje	% Blastocistos	Embriones/Ovario
Aspiración manual con jeringa	82,3	23,2	0,96 ^a
Corte de folículos ("slicing")	84,7	27,6	3,3 ^b

Valores con letras diferentes en la misma columna difieren ($p < 0,05$)

Además de la técnica de recuperación de ovocitos de ovarios de matadero propiamente dicha, existen otras variables que pueden afectar la eficiencia del proceso. Algunos de estos factores ya fueron mencionados como por ejemplo el tiempo total invertido entre el inicio de la colecta y la carga final de los COCs lavados en la placa de maduración. El método slicing podría tener un rendimiento superior en comparación con la aspiración manual por jeringa o bomba de vacío, pero el tiempo de procesamiento podría verse aumentado al requerir un tiempo de búsqueda extendido para identificar los COCs en la placa y de lavado producto del exceso de material adherido y minimizar el riesgo de contaminación. Otros factores involucrados en la eficiencia

global de la recuperación de los ovocitos provenientes del matadero, es la cuestión del intervalo de tiempo entre la faena de los animales y la extracción del ovocito del folículo y la temperatura de transporte (Gordon, 2003g). En general, los ovarios se procesan dentro de las 2 horas posteriores de producida la faena. La temperatura de transporte rondaría los 30°C. La competencia de desarrollo de ovocitos aspirados de ovarios almacenados durante intervalos de tiempo extendidos (>24 h) y temperaturas inferiores a los 20°C y superiores a 41°C, se vería seriamente afectada (Gordon, 2003g). En rigor, existen pocos reportes sobre el efecto del intervalo faena-maduración en la calidad de los ovocitos bovinos recuperados y su potencial de desarrollo, expresión génica y capacidad de implantación. El almacenamiento de los ovarios a 37-39° C durante 5-8 h disminuiría la tasa de maduración de los ovocitos colectados y su capacidad de convertirse en blastocitos después de la fertilización *in vitro* (Yang y col., 1990, Nakao y Nakatsuji, 1992, Abe y Shioya, 1996). Una temperatura de almacenamiento en torno a los 10°C durante un tiempo no superior a las 24 h no afectaría la tasa de maduración o el potencial de desarrollo de los ovocitos en comparación a temperaturas superiores (20°C) y bajas (0°C) y durante tiempos prolongados (48 y 72 h) (Matsushita y col., 2004). Otros estudios mostraron que el almacenamiento de los ovarios a 37°C durante 8 h disminuyó significativamente tanto el clivaje como la tasa de desarrollo embrionario (Yang y col., 1990). Sin embargo, el almacenamiento de los ovarios a 25°C durante un máximo de 11 h no afectaría las tasas de clivaje y desarrollo embrionario (Yang y col., 1990). Otras publicaciones señalan que el almacenamiento de ovarios a 15-21°C durante 24 h no afectaría la tasa de maduración, tasa de clivaje, y la tasa de desarrollo a blastocisto (Schernthaner y col., 1997). A bajas temperaturas (rango 4-10°C), el efecto del almacenamiento parece ser similar al que sucede a altas temperaturas influyendo negativamente en las tasas de clivaje y formación de blastocistos ya a partir de 4 h de conservación (Yang y col., 1990, Nakao y Nakatsuji, 1992, Abe y Shioya, 1993, Abe y Shioya, 1996).

Las posibles causas y efectos del desempeño *in vitro* de los ovocitos colectados de ovarios de matadero almacenados por un período de tiempo prolongado estarían relacionadas a la detención del flujo e irrigación de sangre a los ovarios, y los ovocitos experimentan una condición isquémica. Numerosos estudios han demostrado que ésta condición isquémica puede dar lugar a diversos cambios adversos en los folículos, incluyendo la falta de oxígeno, la acumulación de desechos producto del metabolismo, disminución de la concentración de glucosa y aumento del índice de apoptosis en células de la granulosa (Hyttel y col., 1997, Gordon, 2003f, Gordon, 2003g, Sirard y col., 2006, Wang y col., 2011, Albertini, 2015). Para aliviar o minimizar éstos

efectos adversos, el tiempo de almacenamiento de ovario debe ser tan corto como sea posible (Wang y col., 2011). Sin embargo, esto no siempre es fácil de controlar debido a una serie de factores. El frigorífico ajusta el inicio y fin de cada faena de acuerdo a sexo, número y peso de los animales, necesidad de mantener animales juntos por cliente u origen, capacidad de enfriamiento en las cámaras, momento en que llegan los animales, distribución de la carne envasada, etc. El otro factor es la distancia entre el matadero y el laboratorio. La disminución de la temperatura de almacenamiento de ovario es otra estrategia utilizada para aliviar los efectos adversos causados por condiciones isquémicas durante el transporte ovario (Wang y col., 2011). Ovocitos expuestos a bajas temperaturas durante el transporte ovárico acusaron también algunos efectos adversos como el endurecimiento de la zona pelúcida, alteración de los microtúbulos y el citoesqueleto, y membranas citoplasmáticas dañadas (Arav y col., 1993, Schmidt y col., 1993, Aman y Parks, 1994, Zeron y col., 1999, Ghetler y col., 2005, Ambrosini y col., 2006).

Estudios publicados muestran evidencia que la competencia de desarrollo de ovocitos bovinos se podría mejorar incubando los ovarios durante algunas horas antes de la aspiración de los folículos. El mantenimiento de los ovarios, luego de la faena, a temperaturas cercanas a 30°C durante 3-4 horas habría mejorado significativamente la competencia de desarrollo de los ovocitos (Blondin y col., 1995, Sirard y Blondin, 1996, Blondin y col., 1997a). Los autores sugirieron que un tiempo de 4 horas después de la faena pudo haber creado un microambiente folicular específico en el que se produjeron cambios en el ovocito similares a las que normalmente ocurren en el folículo preovulatorio en las horas previas a la ovulación.

Varios estudios con ovarios de matadero han demostrado una clara relación entre el tamaño del folículo y la calidad de los ovocitos, donde ovocitos recuperados de folículos mayores a 6 mm de diámetro mostraban una competencia de desarrollo superior en comparación con los folículos más pequeños (Lonergan y col., 1994b, Leibfried-Rutledge, 1999, Hendriksen y col., 2000, Fair, 2003, Machatkova y col., 2004). Una posible explicación a los resultados publicados que muestran que los ovocitos bovinos de folículos de diferentes tamaños diferirían en su competencia de desarrollo sería una insuficiente y/o incompleta maduración citoplasmática (Kubota y Yang, 1998). Observando el proceso *in vivo*, el ovocito que ovula del folículo dominante ha pasado por una etapa de crecimiento durante la cual el ovocito se expone a cambios en su micro-entorno folicular que influyen en su calidad (Fair, 2003, Senbon y col., 2003, Gilchrist y col., 2004, Mermillod y col., 2008). Existiría abundante y convincente evidencia

de que la máxima competencia ovocitaria se daría durante el período de desarrollo folicular entre aproximadamente 8 mm y el tamaño preovulatorio (Lonergan y col., 1994b, Hendriksen y col., 2000, Blondin y col., 2002, Fair, 2003, Nivet y col., 2012, Dias y col., 2014).

1.1.3. Competencia del ovocito

El desarrollo de un ovocito competente para afrontar la fecundación en el oviducto puede ser dividido en tres fases. La estructura básica y la capacidad de desarrollo del ovocito se generan durante la primera fase de crecimiento del ovocito cuando el crecimiento del ovocito acompaña al crecimiento folicular del folículo primordial a terciario (antral, 2-3 mm). Durante la fase antral, cuando los folículos de una cohorte alcanzan un diámetro de aproximadamente 3-5 mm, se selecciona un folículo dominante, quedando un grupo de folículos subordinados (Ginther y col., 1989) (ver **Figura 5**). La ultraestructura del ovocito en el folículo dominante entra en una segunda fase (premaduración o capacitación del ovocito) donde las modificaciones que sufre aumentan su competencia de desarrollo. En el folículo ovulatorio, es decir, el folículo dominante de la última onda folicular, el ovocito experimenta una tercera y última fase de cambios ultraestructurales (maduración del ovocito) durante un período de aproximadamente de 24 h entre el pico de LH y la ovulación (**Figura 6**). Cuando los ovocitos son aspirados para PIVE a partir de folículos de 2-8 mm de diámetro, la población folicular puede ser heterogénea y con diferentes niveles de competencia o capacidad de desarrollo. Dentro del pool de ovocitos recuperados, los folículos antrales aspirados pueden provenir de ondas foliculares ovulatorias o no-ovulatorias conteniendo folículos subordinados y el dominante temprano (todavía no seleccionado). En consecuencia, algunos ovocitos no habrían adquirido la competencia de desarrollo de manera completa e incluso algunos de ellos pueden haber iniciado el proceso de atresia. Estudios realizados durante las tres fases de desarrollo del ovocito con el fin de identificar cambios ultraestructurales, se analizaron ovocitos a partir de folículos preantrales (folículos primordiales, primarios y secundarios) (Fair y col., 1997), así como de folículos antrales (Assey y col., 1994) y de los folículos preovulatorios que se aproximan a la ovulación (Hyttel y col., 1986a) (**Figura 6**).

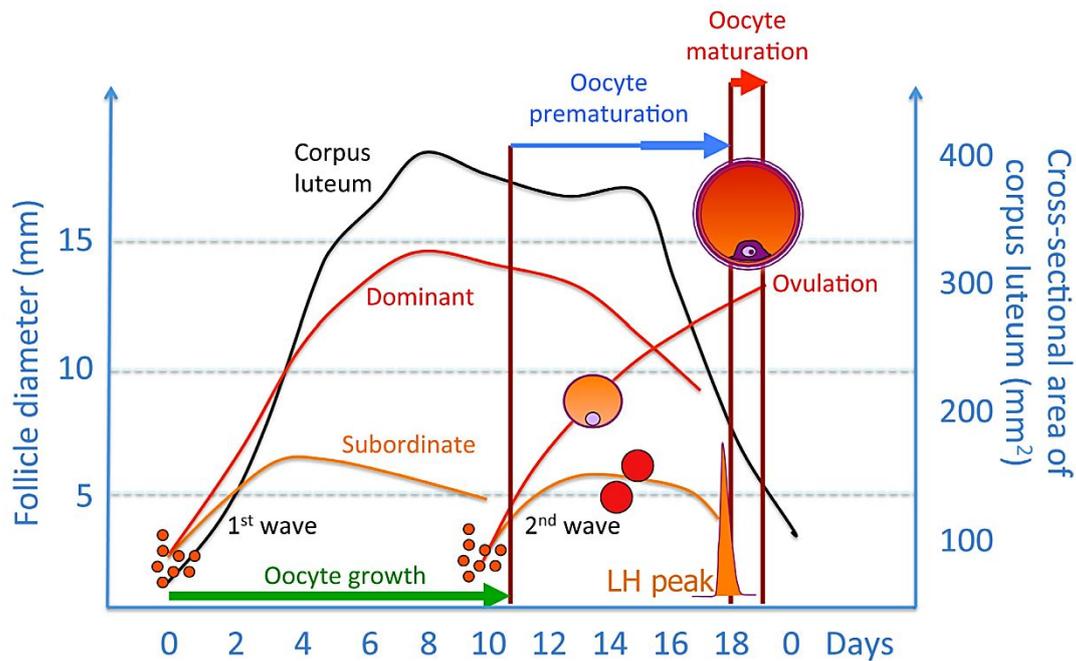


Figura 5: Ondas foliculares y fases de desarrollo de ovocitos en bovinos. El eje X indica días después de la ovulación (Ginther y col., 1997, Ginther y col., 2001).

Claramente, el ovocito experimenta cambios notables durante las fases de crecimiento y pre-maduración. Según estudios funcionales de ovocitos bovinos en diferentes etapas de su desarrollo, los ovocitos recuperado de folículos de menos de 3 mm de diámetro no habrían completado la fase de crecimiento y acumulado suficiente ARNm y proteínas para sostener el desarrollo embrionario posterior (Fair y col., 1995, Fair y col., 1996, Fair y col., 1997). Durante la fase de pre-maduración subsiguiente, el ovocito es sometido a más modulaciones estructurales y aumenta su capacidad de desarrollo (Assey y col., 1994). Sorprendentemente, los ovocitos de los folículos subordinados, que están entrando en la fase temprana de atresia, pueden mostrar cambios muy similares al observado en el ovocito del folículo dominante. Hasta el momento, la evidencia mostraría que los ovocitos de folículos sometidos a pre-maduración o atresia inicial, serían los mejores candidatos para aspirar durante OPU y posterior PIVE (Stroebech y col., 2015). Actualmente, existe una gran necesidad de realizar OPU-PIVE en hembras cada vez más jóvenes para acelerar el progreso genético reduciendo el intervalo generacional y maximizar las predicciones genómicas (Kasinathan y col., 2015). Otros escenarios comprenden la utilización de hembras adultas con registros de producción probados que se encuentran en el período de lactancia o gestando. Los ovarios en hembras jóvenes contienen folículos preantrales y antrales cuyo número varía considerablemente entre individuos (Silva-Santos y col., 2013). El número de

folículos aumenta rápidamente entre los 50-80 días después del nacimiento y hasta los 120 días. Este crecimiento folicular es estimulado por un aumento en la secreción de FSH y LH, y aunque es posible aspirar folículos antrales de hembras muy jóvenes, los ovocitos tendrán una competencia de desarrollo disminuida en comparación con los adultos (Steeves y col., 1999), en relación a su ultraestructura (Duby y col., 1996), el metabolismo (Steeves y Gardner, 1999a) y la maduración citoplasmática (Salamone y col., 2001).

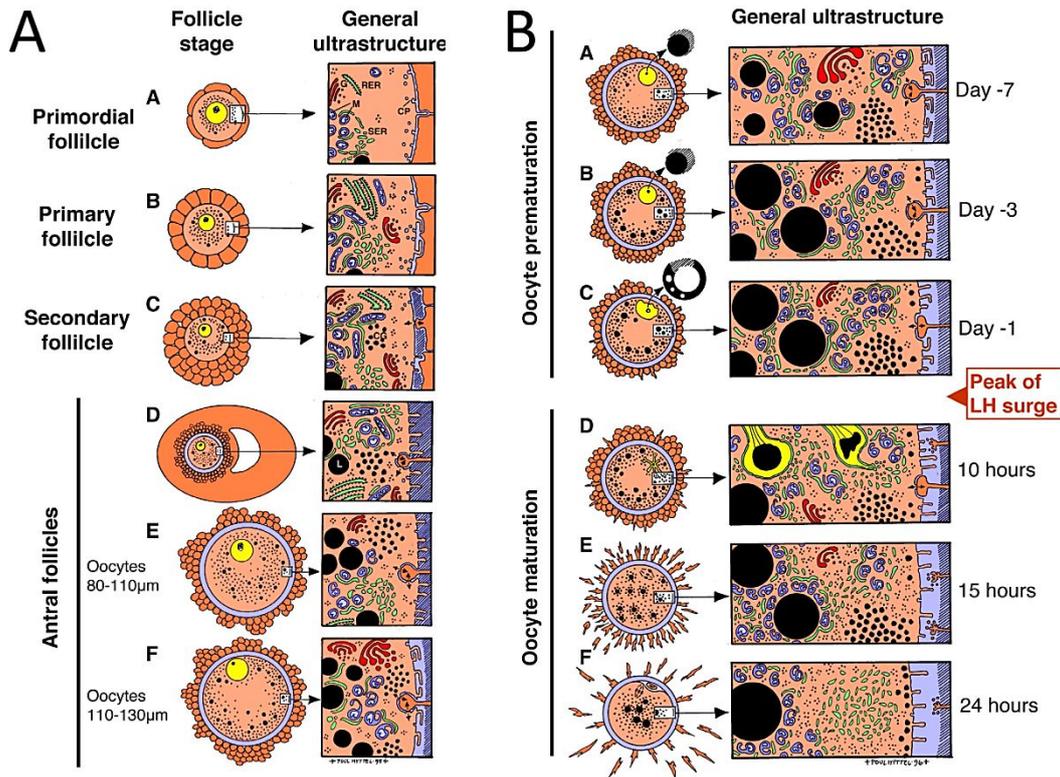


Figura 6: (A) Dibujo esquemático del crecimiento de ovocitos bovinos. (AA) Folículo primordial con el ovocito rodeado por una sola capa de células de granulosa aplanadas. (AB) Folículo primario con el ovocito rodeado por una sola capa de células de granulosa cuboidal. (AC) Folículo secundario con el ovocito rodeado por más de una capa de células de granulosa cuboidales. (AD) Folículo terciario temprano. (AE y AF) Folículo Folículos. (B) Dibujo esquemático de aspectos ultraestructurales de la pre-maduración del ovocito bovino en el folículo dominante hasta el pico de LH y maduración después del pico. (BA) Ovocito de un folículo dominante 6 días antes del pico de LH. La ultraestructura general es idéntica a la obtenida al final del crecimiento del ovocito (AF). (BB) Ovocito de un folículo dominante 3 días antes del pico de LH. (BC) Ovocito de un folículo dominante el día antes del pico de LH. (BD) Ovocito en "ruptura de la vesícula germinal" de un folículo ovulatorio a las 9-12 h después del pico de LH. (BE) Ovocito en MII en un folículo ovulatorio a las 15 h después del pico de LH. (BF) Ovocito en MII en un folículo ovulatorio aproximadamente 24 h después del pico de LH (Hytel, 2011).

En vacas posparto de alta producción, se registran bajas concentraciones de esteroides circulantes debido al efecto combinado entre el metabolismo aumentado producto de la lactancia y al efecto dilución debido a la mayor filtración hepática. Esto podría indicar que los folículos dominantes están produciendo menos estrógeno lo cual afectaría la fase de crecimiento folicular (Lopez y col., 2004, Sartori y col., 2004). El balance energético negativo en las hembras lactantes posparto tiene un efecto adverso sobre la calidad de los ovocitos, debido a los cambios en los perfiles endocrinos y metabólicos (Leroy y col., 2008a). En las hembras gestantes, el crecimiento folicular podría verse afectado por niveles elevados de progesterona (Adams y col., 1992). Los resultados de OPU-PIVE en bovinos dependen del estado reproductivo y fisiológico de la donante de ovocitos, y otros componentes como la genética, edad, raza, nutrición, nivel de producción de leche, estatus de la onda folicular, protocolo de sincronización y superestimulación, entre otros (de Wit y col., 2000, Merton y col., 2003, Machatkova y col., 2004, Merton y col., 2009).

1.1.4. Factores que afectan la calidad del ovocito

En la búsqueda de maximizar el desempeño de los ovocitos y cigotos durante el proceso *in vitro*, una cuestión de gran importancia es la capacidad del ovocito para experimentar, reaccionar y sobrepasar con éxito las distintas fases de la PIVE (maduración, fertilización y desarrollo embrionario temprano), la implantación, el desarrollo fetal y el parto. Esta capacidad o competencia del ovocito esta influenciada por varios factores (Gordon y Lu, 1990, Fukui y col., 1991, Ward y col., 2000b, Driancourt, 2001, Lonergan y col., 2001, Krisher, 2004, Sirard y col., 2006, Mermillod y col., 2008). Algunas de las características asociadas con los ovocitos menos competentes pueden ser visibles de inmediato en la lupa estereoscópica, mientras que otras pueden no ser tan evidentes hasta la fecundación del ovocito o el inicio del período de cultivo. Las situaciones más comunes en las cuales se presenta problemas en la calidad de los ovocitos recuperados son en las hembras muy jóvenes o geriátricas. Otra categoría afectada son las hembras con algún grado de infertilidad conocidas como "vaca problema". El poder superar el bajo desempeño de los ovocitos colectados de hembras jóvenes o pre-púberes representa el mayor desafío e interés ya que el avance del análisis genómico ejerce una fuerte presión para obtener embriones viables y preñeces de éstos animales (Revel y col., 1995, Duby y col., 1996, Khatir y col., 1996, Presicce y col., 1997, Gandolfi y col., 1998, Khatir y col., 1998a, Khatir y col., 1998b, Steeves y Gardner, 1999a, Steeves y col., 1999, Armstrong, 2001). Al igual que con ovocitos de bovinos adultos, el tamaño de los ovocitos de ternera tiene una marcada influencia

sobre su capacidad para avanzar a la fase de metafase II (Majerus y col., 1999, de Paz y col., 2001). Un estudio reportó que las tasas de fertilización y de eclosión de ovocitos provenientes de terneras 3 meses de edad no difirieron significativamente de los de ovocitos de hembras adultas, pero la tasa de producción de blastocistos fue casi la mitad en comparación con las vacas (11.9% vs. 20%) (Revel y col., 1995). La adición de factores de crecimiento al medio de maduración (IVM) podría corregir esta deficiencia (Zhang y col., 2010, Sudiman y col., 2014, Machado y col., 2015). La incorporación del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en el medio IVM alteró el patrón de síntesis proteica en los ovocitos recuperados de terneras y aumentó significativamente el rendimiento de la formación de blastocistos (Khatir y col., 1996, Khatir y col., 1998a, Khatir y col., 1998b). La actividad metabólica y la síntesis de proteínas entre ovocitos de hembras adultas en comparación con terneras pre-púberes son significativamente diferentes, lo cual explicaría la disminuida capacidad de desarrollo (Gandolfi y col., 2000). La suplementación exógena de estrógenos, progesterona y gonadotrofinas en terneras pre-púberes con el objetivo de mejorar la capacidad de desarrollo resultaría ser eficiente aunque presenta igual gran variabilidad entre donantes y solo se produjo embriones en el 50% de las terneras tratadas (Galli y Lazzari, 1996). Los ovocitos de terneras pre-púberes pueden ser más pequeños en diámetro que los de hembras adultas y otras características que pueden afectar la fecundación como ser el retraso en la formación áster espermático y la formación del pronúcleo de manera asincrónica (Duby y col., 1995). Al tratar de determinar una posible causa de la baja competencia en el desarrollo de ovocitos de hembras pre-púberes, se encontró que los ovocitos de eran menos sensibles a los agonistas liberadores de calcio y que un número significativamente alto de ovocitos no presentó oscilaciones normales de calcio después de la penetración del espermatozoide (Damiani y col., 1995, Damiani y col., 1998). Muchas proteínas constitutivas de las células del cumulus observadas en ovocitos de vacas adultas diferían de las de terneras y varias otras proteínas estaban ausente en ovocitos de ternera, sugiriendo que tales proteínas podrían ser importantes para la iniciación de la cascada de eventos que se requiere para el desarrollo normal del ovocito bovino (Levesque y Sirard, 1994). Utilizando sistemas de monitoreo mediante cámaras de video cinematográficas se observó durante el cultivo de embriones derivados de ovocitos de terneras pre-púberes una mayor frecuencia de detención del desarrollo antes del noveno ciclo de división celular y una fase de retraso más larga antes del comienzo del control del genoma embrionario (Majerus y col., 2000). Además de proteínas faltantes se observaron diferencias en los perfiles de algunas proteínas entre ovocitos de hembras adultas y terneras pre-púberes, y que este cambio en el patrón de síntesis proteica estaría asociado a una deficiente progresión durante el proceso de maduración nuclear (Khatir y col., 1998a, Khatir y

col., 1998b). Diferencias en las características citoplasmáticas entre ovocitos de terneras pre-púberes y hembras adultas fueron encontradas y que solo podían reducirse en parte mediante el pre-tratamiento con FSH (Massicotte y col., 1999). Esta variabilidad en la competencia de desarrollo de ovocitos de terneras pre-púberes también se extiende a vaquillonas jóvenes (14-15 meses de edad) (Taneja y col., 2000). Otros estudios señalan que la pobre competencia de desarrollo de ovocitos de terneras pre-púberes se debe a la falta de factores ooplásmicos esenciales para el desarrollo. En particular, la actividad del factor promotor de maduración (FPM), la proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la cantidad relativa del receptor del inositol trifosfato (IP3R) mostraron niveles sustancialmente más bajos en ovocitos de ternera pre-púberes madurados *in vitro* en comparación con los de hembras adultas (Salamone y col., 2001). Esto sugiere claramente que ciertos componentes claves en el ooplasma en el ovocito de hembras pre-púberes asociados con la fertilización, el desarrollo embrionario temprano, y la eclosión estarían comprometidos (Duby y col., 1996, Gandolfi y col., 1998, Gandolfi y col., 2000, Lonergan y Fair, 2016).

La producción de embriones PIVE en los '80 se originaba fundamentalmente de los ovarios bovinos colectados en los mataderos. El desempeño de los ovarios provenientes de vaquillonas versus vacas adultas es controversial. En determinadas situaciones, la calidad de los ovocitos recuperados de ovarios de vaquillona es igual o superior a los de ovarios de vaca (Gordon, 2003g). La calidad de los ovocitos de hembras adultas depende si se trata de hembras refugio o enviadas al matadero por razones salud y/o fertilidad. En ambos casos, la calidad de los ovocitos recuperados generalmente está comprometida (Rizos y col., 2005). Situación contraria puede darse cuando las hormonas se utilizan para la promoción del crecimiento y engorde del ganado vacuno, la experiencia puede ser muy diferente. El desarrollo embrionario de ovocitos provenientes de ovarios de vacas sin tratamiento hormonal y vaquillonas suplementadas con hormona de crecimiento fue significativamente diferente (16% versus 34% de producción de embriones entre vaquillonas y vacas, respectivamente) (Checura y col., 2002).

El número de folículos y calidad de los ovocitos podría verse afectada dependiendo del momento del ciclo estral en que son recuperados y si los folículos se encuentran ipsilateral o contralateral al cuerpo lúteo. Ovocitos de mayor calidad se obtienen de ovarios durante la fase luteal y de los ovarios donde el cuerpo lúteo está presente (Boediono y col., 1995, Sugulle y col., 2008). La progesterona generada por el cuerpo luteo y/o administrada de manera exógena podría contribuir a mejorar la calidad del COCs (Lonergan, 2011, Salehnia y Zavareh, 2013). La

competencia de desarrollo de ovocitos colectados de donantes en distintas etapas del ciclo sería marcadamente diferente donde una proporción significativamente mayor de ovocitos desarrollaría a blastocistos cuando son recuperados entre los días 14-16 del ciclo estral (Machatkova y col., 1996). A medida que el ovocito crece dentro del folículo, una serie de factores influyen en su salud y la competencia de desarrollo. Estos factores incluyen el tamaño del folículo, día del ciclo estral, el nivel o grado de atresia y la influencia de otros folículos tales como el folículo dominante (Hagemann, 1999, Hendriksen y col., 2000, Machatkova y col., 2004, Lucy, 2007a). La producción de embriones mostraría un aumento si la recuperación de ovocitos se realiza durante la fase de crecimiento de la primera onda folicular (Machatkova y col., 2000, Machatkova y col., 2004).

Varios sistemas de clasificación para evaluar la condición corporal y el estado nutricional de los reproductores se han desarrollado a lo largo de los años (Edmonson y col., 1989, Bewley y Schutz, 2008, Roche y col., 2009). Diversos autores han tratado de analizar la correlación entre el potencial de desarrollo de los ovocitos en relación a la condición corporal y estado nutricional (Dominguez, 1995, Snijders y col., 2000, Boland y col., 2001, Krisher, 2004, Sirard y col., 2006, Ashworth y col., 2009, Chrenek y col., 2015). La cantidad de folículos ováricos y la proporción de ovocitos de buena calidad es significativamente menor en las vacas con un índice de condición corporal bajo (Ruiz López y col., 1996, Fazio y col., 1999, Snijders y col., 2000). El sistema de alimentación y la dieta ofrecida a las hembras donantes de ovocitos puede afectar la población folicular y la competencia de los COCs ya sea por deficiencia, exceso y/o la interacción de los mismos en el rumen (Pryce y col., 2004, Santos y col., 2008). Esto podría desencadenar un desorden metabólico que altere o modifique la secreción de gonadotrofinas, dinámica folicular y la interacción folículo-ovocito (Butler, 1998, Butler, 2000, Armstrong y col., 2003, Webb y col., 2004, Wathes y col., 2007). El régimen alimentario y la dieta elegida afectan la competencia de desarrollo de los ovocitos principalmente cuando se generan altos niveles circulantes de amoníaco en plasma (McEvoy y col., 2001). Existe evidencia que sugiere que diferentes regímenes nutricionales pueden afectar la expresión de genes importantes en el desarrollo embrionario (Niemann y Wrenzycki, 2000, Bilodeau-Goeseels y Panich, 2002, Lonergan y col., 2006). La dieta puede influir en la maduración de los ovocitos, el desarrollo embrionario temprano, y en el microambiente del tracto reproductivo (Kruip y col., 2000, O'Callaghan y col., 2000, Picton y col., 2003, Sutton y col., 2003, Ashworth y col., 2009, Leroy y col., 2011, Krisher, 2013). La población folicular y la calidad ovocitaria mostró diferencias entre vacas post-parto a principio y mediados de la lactancia demostrando la influencia del balance energético

(Gwazdauskas y col., 2000, Walters y col., 2002). La conclusión que se desprende de casi todos los reportes publicados es que los efectos de la nutrición/alimentación se manifiestan durante el desarrollo embrionario temprano, y posiblemente se origine durante la adquisición de la competencia de desarrollo del ovocito (Armstrong y col., 2003, Pryce y col., 2004, Webb y col., 2004, Roche, 2006, Wathes y col., 2007, Leroy y col., 2008a, Leroy y col., 2008b, Ashworth y col., 2009, Leroy y col., 2011, Hernandez-Medrano y col., 2012, Krisher, 2013). Para obtener un rendimiento óptimo de la reproducción, las necesidades nutricionales del animal deben ser suministrados de manera fisiológica, evitando cantidades anormales o no balanceadas de cualquiera de los componentes de la dieta y este equilibrio nutricional es aún más importante en el ganado lechero de alto rendimiento (Beam y Butler, 1999, Butler, 2000, Butler, 2003, Pryce y col., 2004, Roche, 2006, Santos y col., 2008).

Otra fuente importante de variación es el factor animal. Un ejemplo en tal sentido es el impacto del estado fisiológico de la donante donde hembras preñadas pueden producir un mayor número de ovocitos de alta calidad que los animales cíclicos, probablemente debido a los niveles circulantes de progesterona más altos y la activa generación de ondas foliculares ováricas (Ferré y col., 2002). El mérito genético en vacas lecheras de alta producción puede afectar a la calidad de sus ovocitos (Snijders y col., 2000). Las principales conclusiones de este estudio fueron que los ovocitos de vacas de alto mérito genético tuvieron tasas más bajas de clivaje y produjeron un menor número de blastocistos en comparación con las vacas de mérito genético intermedio, no obstante, el número de ovocitos recuperados no difirió. Entre las vacas de alta y baja producción de leche no hubo diferencias en el número de ovocitos recuperados, clivaje y producción de embriones, mostrando que la producción de leche per se no tiene ningún efecto en la calidad de los ovocitos (Snijders y col., 2000). Desde hace muchos años que los objetivos de mejoramiento en los programas de selección de reproductores se focalizan exclusivamente en la producción de leche. Esto trajo aparejado una importante disminución del mérito genético para características asociadas a la fertilidad (Shook, 2006, Lucy, 2007b, Berglund, 2008, Butler, 2013). En los últimos años, los mecanismos fisiológicos subyacentes responsables de este descenso han comenzado a ser descifrado. Parecería que un mérito genético bajo para características de fertilidad se asocia con múltiples defectos a toda una serie de órganos y tejidos cuya función es clave a para lograr un desempeño satisfactorio en materia de índices reproductivos (Snijders y col., 2001, Shook, 2006, Berglund, 2008, Butler, 2013). Entre los principales defectos asociados al mérito genético se incluyen la movilización excesiva que afecta la condición corporal, un estado metabólico desfavorable, la reanudación tardía de la ciclicidad, aumento de la incidencia de

endometritis, expresión disfuncional del celo y concentración de progesterona inadecuada (Harrison y col., 1990, Lucy, 2001, Pryce y col., 2004, Lucy, 2007b, Berglund, 2008, Butler, 2013). La alta producción de leche produce adaptaciones metabólicas necesarias para poder sostenerla, y sumado a una dieta estimulante de la producción, pueden contribuir a producir embriones de inferior calidad de color más oscuro debido al alto contenido de lípidos (Leroy y col., 2005, Leroy y col., 2008b, Leroy y col., 2014). La baja calidad del ovocito y el embrión son reconocidos como factores importantes implicados en las bajas tasas de concepción y en la alta prevalencia de mortalidad embrionaria temprana (Ashworth y col., 2009). Además de la importancia del equilibrio energético, la endocrinología asociada y sus consecuencias metabólicas, hay un interés creciente en promover dietas ricas en energía y proteína. En este contexto, dietas orientas en tal sentido pueden mejorar el estado y balance energético y por lo tanto promover la actividad ovárica en el período posparto temprano, pero la calidad de los ovocitos y embriones pueden verse afectadas negativamente (Butler, 1998, Butler, 2000, Leroy y col., 2005, Ashworth y col., 2009). La suplementación con grasa en la dieta tiene un efecto dual estimulando la producción de esteroides ováricos mientras que el ovocito y el embrión muestran un metabolismo alterado y la acumulación excesiva de lípidos (Fouladi-Nashta y col., 2007, Leroy y col., 2008a, Leroy y col., 2008b, Cerri y col., 2009). Las dietas altas en proteínas pueden elevar las concentraciones de amoníaco y urea en la sangre, lo que afecta negativamente los ambientes intrafolicular, oviductal y el útero (McEvoy y col., 2001). Los ovocitos y embriones son muy sensibles a cambios en su microambiente, lo que puede dar lugar a una maduración incompleta y/o anormal, afectar la fertilización y la división temprana (Butler, 1998, McEvoy y col., 2001, Adamiak y col., 2006, Ashworth y col., 2009, Krisher, 2013).

El medio ambiente es otro factor importante que puede afectar la capacidad de desarrollo de los ovocitos. Entre los factores más estudiados figuran el estrés calórico o térmico (EC). El EC está provocado por valores de ITH (Índice de Temperatura-Humedad) que superan el umbral crítico de confort animal ($ITH \geq 72$, aunque algunos estudios lo consideran a partir de 68, (Collier y col., 2006, Renaudeau y col., 2012, Roy y Collier, 2012). Los efectos del EC pueden agravarse como consecuencia del efecto aditivo producto del calor interno generado de origen metabólico en la vaca durante el pico de lactancia. Los efectos negativos del EC en el ovario son comparables a lo que sucede en los testículos bajo similar estrés (Walters y col., 2006). Ovocitos colectados de vacas en producción durante el periodo de verano bajo condiciones de EC experimentaron una reducción en su capacidad de desarrollo *in vitro* (Rocha y col., 1998, Rutledge y col., 1999). A la pérdida en la capacidad o competencia de desarrollo del ovocito y falla en el desarrollo temprano

pre-implantacional, se le suma una reducción significativa en la tasa de concepción y en la calidad embrionaria por acción del EC (Putney y col., 1988, Sartori y col., 2002). La exposición de ovocitos en cultivo *in vitro* a temperaturas elevadas durante su maduración disminuye la tasa de clivaje y la proporción de ovocitos que se desarrollan a blastocitos (Edwards y Hansen, 1997). Estos reportes indican que los efectos del EC sobre el ovocito y su desarrollo temprano puede afectar negativamente el normal crecimiento y calidad del embrión e incrementar pérdidas embrionarias (Putney y col., 1989).

1.2. Maduración *in vitro* de los ovocitos

En la mayoría de las especies de mamíferos, el ovocito se desarrolla y madura dentro del entorno folicular. Como tal, múltiples tipos de células son responsables de crear el entorno al que se expone el ovocito (**Figura 7**). Las células de la teca, células de la granulosa, células del cumulus, y el propio ovocito participan en una compleja interacción de señalización para controlar tanto la competencia como el crecimiento folicular (Krisner, 2004, Krisner, 2013, Albertini, 2015). El ambiente folicular es modificado por las células foliculares de manera constante, especialmente cuando se acerca a la ovulación. Dentro de este entorno, el ovocito y las células del cumulus que lo rodean conforman en realidad una unidad funcional, con comunicación dinámica que se produce entre cada tipo de célula (Krisner, 2004, Krisner, 2013). El ovocito segrega factores que regulan la función de las células del cumulus y el desarrollo folicular, y las células del cumulus transportan las moléculas y sustancias necesarias para el crecimiento del ovocito y su maduración, tanto nuclear como citoplasmática (Eppig, 2001, Gilchrist y col., 2004, Hussein y col., 2006, Gilchrist y col., 2008, Gilchrist, 2010). De esta manera, el ovocito puede crear un microambiente óptimo dentro del folículo en el que se puede desarrollar y alcanzar la competencia máxima (Duranthon y Renard, 2001, Fair, 2003). La capacidad del ovocito de producir y secretar factores estimulantes de crecimiento, así como también la capacidad de las células del cumulus en responder adecuadamente a esos estímulos, contribuye a la adquisición de la competencia (Gandolfi, 1998, Barnes y Sirard, 2000, Sirard y col., 2006, Hirao, 2011).

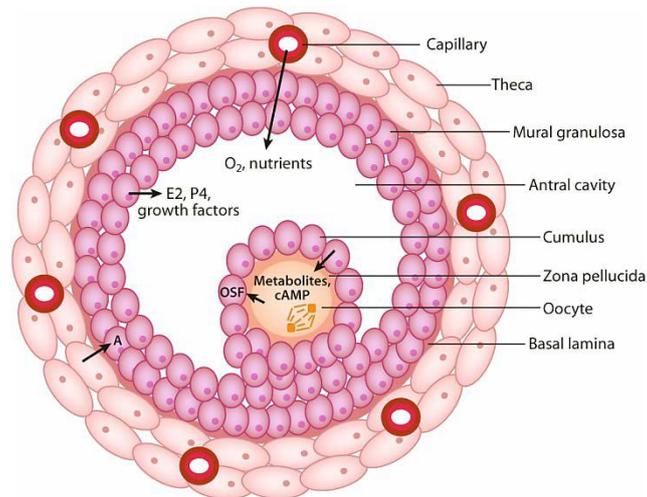


Figura 7: Diagrama de un folículo ovárico preovulatorio de ovario que muestra los múltiples tipos de células implicadas en el mantenimiento del medioambiente folicular y determina la competencia del ovocito. Abreviaturas: A= andrógenos; AMPc= AMP cíclico; E2= estrógeno; OSF= factores secretados por el ovocito; P4= progesterona (Krisher, 2013).

La maduración ovocitaria o "maduración meiótica" define el período en el que el ovocito reinicia la meiosis (interrumpida en estado diploteno de la profase I) hasta el estadio de metafase II (MII). En este estado, los ovocitos adquieren la competencia y maquinaria necesaria para sortear la fertilización y comenzar el desarrollo embrionario (Brackett y col., 1978, Brackett y col., 1982, Brackett, 1985, Leibfried-Rutledge y col., 1987, Leibfried-Rutledge y col., 1989, Eppig, 2001, Eppig y col., 2002, Clift y Schuh, 2013, Krisher, 2013). Durante la maduración, el ovocito sufre una serie de cambios en su núcleo y en su citoplasma. Estos cambios incluyen la redistribución de organelas celulares, migración de mitocondrias a una posición perinuclear, acumulación de los gránulos corticales a lo largo del oolema, un fuerte incremento en la síntesis de proteínas y la ruptura de la membrana nuclear (de Loos y col., 1992, Picton y col., 2003, van den Hurk y Zhao, 2005). Este proceso también incluye una serie de cambios complejos a nivel de fosforilación de proteínas y señales entre el núcleo, citoplasma y organelas (Schmitt y Nebreda, 2002, Tomek y col., 2002, Vigneron y col., 2004, Conti y col., 2012, Holt y col., 2013, Adhikari y Liu, 2014), que transforma el ovocito primario en un ovocito secundario maduro.

La meiosis *in vivo* se reinicia mediante el estímulo hormonal provocado por la liberación de LH y en condiciones *in vitro*, es posible lograr que el proceso meiótico continúe bajo condiciones de cultivo controladas (Ball y col., 1984, Leibfried-Rutledge y col., 1989, Sirard y col., 1989, Allworth y Albertini, 1993, Homa, 1995, Sirard y col., 1998, Sirard, 2001, Gilchrist, 2010). La maduración meiótica se caracteriza por la disolución de la membrana nuclear (vesícula germinal), la

condensación de la cromatina formando cromosomas bivalentes distinguibles, la separación de los cromosomas homólogos, la emisión del primer cuerpo polar, y la detención en metafase II con los cromosomas alineados en el huso acromático (Sagata, 1996, Nebreda y Ferby, 2000, Kishimoto, 2003, Mehlmann, 2005, Liu y col., 2013, Adhikari y Liu, 2014). Los ovocitos que han ovulado o extraídos del folículo, completan la meiosis con la separación de las cromátidas y la extrusión del segundo cuerpo polar (segunda división reduccional) que se completa en el momento de la fecundación inducido por la penetración del espermatozoide (Alberts y col., 2013, Alberts y col., 2014, Cohen y Holloway, 2015).

La capacidad que adquieren los ovocitos detenidos en el estadio de dictioteno durante la profase I (entre el diplonema y la diacinesis) de la meiosis I, que retarda la entrada a la metafase I y progresar hacia la etapa reduccional de la meiosis, se denomina competencia meiótica (Albertini y Carabatsos, 1998, Miyano, 2003, Miyano y Manabe, 2007, Alberts y col., 2013, Alberts y col., 2014). Existen factores reguladores secretados por las células de la granulosa que mantienen la detención de la meiosis hasta que se produce el pico de LH, momento en el que las células foliculares se separan del ovocito impidiendo así la llegada de más sustancias inhibitorias (Canipari, 2000, Fan y Sun, 2004, Landim-Alvarenga y Maziero, 2014).

La maduración citoplasmática es necesaria para adquirir las condiciones que permiten bloquear la polispermia, para decondensar el núcleo del espermatozoide y para la formación del pronúcleo masculino luego de la fecundación (Gordon, 2003f).

El crecimiento del ovocito bovino en las semanas previas a la ovulación consiste en una serie de transformaciones en las organelas y un período de transcripción (Hytel y col., 1997) los cuales son esenciales para reanudar la meiosis y lograr competencia de desarrollo. A medida que el folículo avanza en su crecimiento, el ovocito va adquiriendo gradualmente la competencia para someterse a la maduración meiótica y proseguir el desarrollo embrionario. En el folículo dominante, el ovocito sufre nuevas modificaciones ultraestructurales y alcanza la competencia de desarrollo de manera completa (Hytel y col., 1997). Los eventos requeridos para la maduración dentro del folículo dominante preovulatorio son disparados por el pico preovulatorio de LH. En las próximas 24 h, el ovocito primario se somete a la progresión de la metafase II de la meiosis y a diversos cambios en la organización de su citoplasma, que incluyen alineación de gránulos corticales lo largo de la oolemma, reordenamiento de las mitocondrias, el desarrollo de la reserva de lípidos y la reducción del compartimiento de Golgi. El aumento en la reserva de lípidos se

deba a la necesidad de contar con una fuente de energía extra para sostener metabolismo, funciones y procesos durante la maduración y posterior desarrollo (Ferguson y Leese, 2006). Durante la maduración final del ovocito, el folículo en sí también sufre una serie de cambios. Las células de la granulosa detienen la síntesis de estradiol y la pared del folículo se luteiniza justo antes de la ovulación; coincidiendo con un marcado incremento en la síntesis de progesterona y expansión de las células del cumulus (Lonergan y Fair, 2016). A medida que el ovocito madura en respuesta a la descarga preovulatoria de LH, las células del cumulus secretan ácido hialurónico (HA) (Gutnisky y col., 2007). Cuando el HA se hidrata, los espacios entre las células del cumulus se agrandan formando una matriz; proceso que se denomina expansión del cumulus (Hytel y col., 1987, Zhang y col., 1995). Después de que el ovocito es liberado del folículo, las células de la granulosa junto con las células de la teca se someten a un proceso de diferenciación y luteinización para formar el cuerpo lúteo (Hytel y col., 1986a, Hyttel y col., 1989). Con la liberación del ovocito secundario y sus células circundantes en el oviducto después de la ovulación, la denudación del cumulus-ovocito complejo (COC) se produce dentro de unas pocas horas. La maduración nuclear del ovocito bovino comienza con la ruptura de la vesícula germinal (GVBD) (Thibault y col., 1987). La GVBD se caracteriza por condensación gradual de la cromatina, la descompactación del nucleolo y la desintegración de la membrana nuclear. El control del ciclo celular a nivel molecular ha permitido una mejor comprensión de la cascada de eventos que conduce y regula la maduración del ovocito (Sirard y col., 1989, Wu y col., 1997, Fulka y col., 1998, Heikinheimo y Gibbons, 1998, Roche y col., 1998, Sirard, 2001, Landim-Alvarenga y Maziero, 2014). La maduración es activada y regulada por la acción coordinada de dos quinasas, el factor promotor de la maduración (FPM) y la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). La actividad del FPM aparece poco antes de GVBD alcanza su máximo nivel en ovocitos en MI, disminuye luego durante la transición de MI a MII y recupera su pico de nivel nuevamente en la MII (Gordo y col., 2001, Fan y Sun, 2004, Sun y col., 2009, Tripathi y col., 2010). Oscilaciones importantes en el pH intracelular se producen de manera coincidente con cambios en la actividad del FPM mostrando la correlación entre pH intracelular, a progresión meiótica y la actividad FPM durante el proceso de maduración del ovocito (Edwards y col., 1999, FitzHarris y Baltz, 2009). Los cromosomas se condensan de forma compacta y se disponen en la placa ecuatorial del huso meiótico. Los microtúbulos y microfilamentos son los principales componentes del citoesqueleto y juegan un importante papel en la modulación del movimiento cromosómico y la división celular en el ovocito bovino (Kim y col., 2000). El ovocito se somete a su primera división meiótica con la extrusión del primer cuerpo polar en el espacio perivitelino. El ovocito, que ahora se denomina ovocito secundario, comienza la segunda división

meiótica y continúa hasta que alcance la fase MII. La segunda división meiótica no se completa a menos que se produzca la penetración del espermatozoide. La finalización de la segunda división meiótica se acompaña de extrusión del segundo cuerpo polar en el espacio perivitelino. El ovocito en esta etapa contiene un número haploide de cromosomas y todo el proceso de maduración se completa en aproximadamente 24 horas (**Figura 8**).

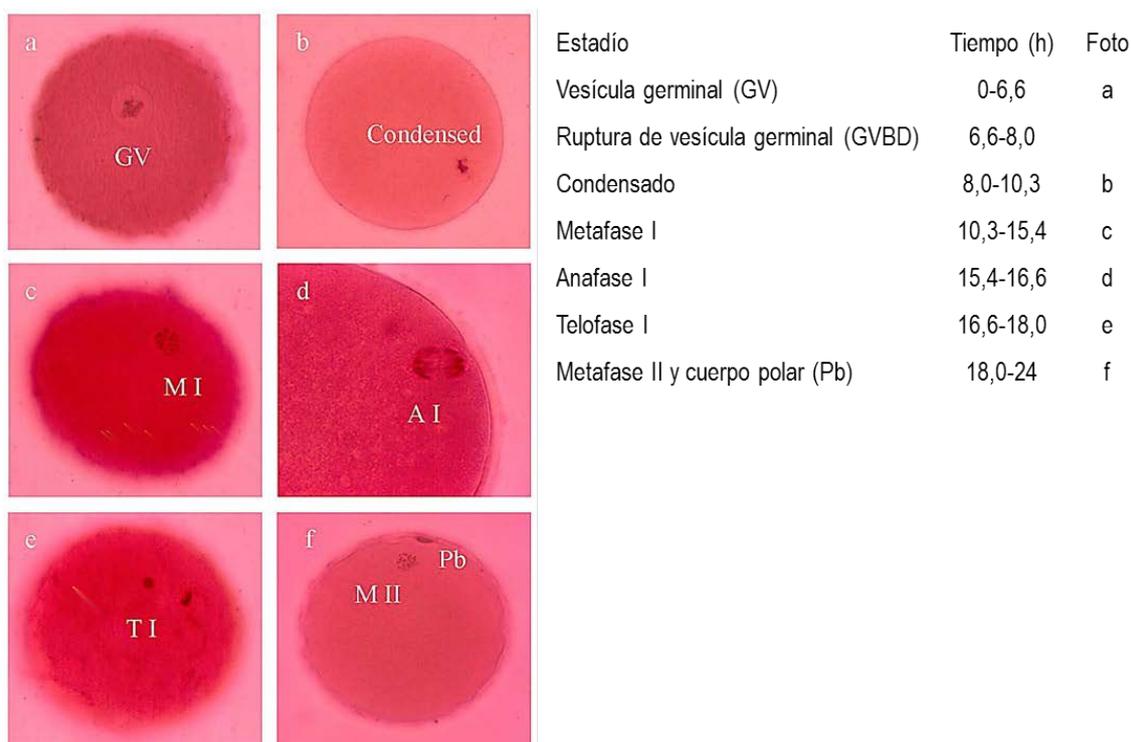


Figura 8: Estadios de maduración nuclear en ovocitos bovinos (Mayes, 2002) y momento de la meiosis que se encuentra cada estadio (Sirard y col., 1989).

Desde el punto de vista bioquímico, la maduración del ovocito se puede dividir en una fase inductiva y una fase de síntesis. La fase inductiva tiene una duración de 6-8 horas y culmina con GVBD. Durante esta fase, el ovocito se somete a una reprogramación dentro del folículo. En la fase de síntesis, que tiene una duración de 18 horas, hay una reestructuración total de los elementos nucleares y citoplasmáticos (Fair y col., 2001a, Laurincik y col., 2003). Durante la fase de inducción de la maduración las células del cumulus jugarían un rol muy importante actuando como reguladores de la síntesis de ARN (Sirard y col., 1998). A medida que avanza la meiosis en el ovocito bovino, hay un gran incremento en la fosforilación de las proteínas. La fosforilación y desfosforilación de proteínas desempeñan un papel clave en la regulación de la maduración meiótica (Kastrop y col., 1990, Kastrop y col., 1991, Tomek y col., 2002, Vigneron y col., 2004, Ferreira y col., 2009). Toda esta evidencia respalda que la competencia de desarrollo del ovocito

bovino se adquiere gradualmente (Gandolfi, 1998, Gandolfi y Gandolfi, 2001, Gosden, 2002, Watson, 2007). Los factores maternos son esenciales para sostener el desarrollo durante la etapa inicial de desarrollo embrionario hasta la etapa de 8-16 células. Los ovocitos acumulan una gran cantidad de ARNm que será fundamental en el desarrollo embrionario posterior. Toda esta maquinaria de transcripción se encuentra en silencio durante la maduración meiótica y la embriogénesis temprana, y por lo tanto los primeros acontecimientos decisivos en el desarrollo del embrión antes de la iniciación de la transcripción del genoma embrionario son dirigidas por la traducción de ARNm maternos preexistentes (Duranthon y Renard, 2001, Gandolfi y Gandolfi, 2001, Bettgowda y Smith, 2007). Los ovocitos muestran notables mecanismos de regulación post-transcripcional para controlar la estabilidad del ARNm y su traducción. Pero cierto es que no todos los ovocitos recuperados del ovario de una vaca tienen la capacidad de desarrollarse en un embrión viable. A pesar de los esfuerzos realizados en tratar de recrear o simular las condiciones y micro-ambiente *in vivo*, la tasa actual de producción de blastocistos no supera el 30 a 40% (Lonergan y Fair, 2016). Los estudios realizados sobre la foliculogénesis y los factores hormonales que la controlan o modifican han demostrado que la competencia de desarrollo del ovocito se adquiere bajo condiciones específicas en el folículo (Nagai, 2001, Eppig y col., 2002, Picton y col., 2003, Hutt y Albertini, 2007, Landim-Alvarenga y Maziero, 2014). Está claro que las células que rodean el ovocito son cruciales para lograr su maduración completa en condiciones de cultivo en el laboratorio (Hyttel, 1987, Canipari, 2000, Ferreira y col., 2009, Li y Albertini, 2013). La maduración del ovocito en dentro del folículo se entiende que es un proceso gradual y que ciertos pasos cruciales en el proceso de maduración deben producirse antes del pico ovulatorio de LH. En términos prácticos significa que los ovocitos provenientes de ovarios de matadero no deben ser aspirados inmediatamente si no que deben mantenerse durante algunas horas en el ovario antes de la aspiración recuperación (Blondin y col., 1997a, Blondin y col., 1997b, Sirard y col., 1999). Durante ese lapso de tiempo, el microambiente folicular puede ejercer una influencia decisiva sobre la competencia del ovocito. Otras formas en que se puede manipular la influencia del folículo en la calidad del ovocito es el de producir un período de carencia después de la estimulación con FSH sobre la donante antes de aspirar los ovocitos. Cuando una onda folicular es inducida y estimulada mediante FSH por al menos 3 días consecutivos en ausencia de un folículo dominante, y seguido por un período de no estimulación (o carencia) antes de la aspiración folicular tiene un efecto positivo en la producción de blastocistos (Blondin y col., 1997b, Sirard y col., 1999). Entre 36 a 65 horas sin FSH antes de la recuperación de los ovocitos han resultado estrategias superadoras en comparación al grupo control (Blondin y col., 1997b, van Wagtenonk-de Leeuw y de Ruigh, 1999, Blondin y col., 2002,

Mullaart y col., 2002, Chaubal y col., 2006, Durocher y col., 2006, Chaubal y col., 2007, Sirard y col., 2007, De Roover y col., 2008, Sendag y col., 2008, Nivet y col., 2012, Dias y col., 2014). El folículo debe llegar a una etapa de meseta en su crecimiento para inducir al ovocito a realizar los cambios finales necesarios antes de la ovulación. Si el crecimiento folicular se produce de manera rápida, los ovocitos no adquieren la competencia de desarrollo de manera completa (Sirard y Blondin, 1998). Por esa razón, el período de meseta en el final de la fase de crecimiento del folículo, lo que resulta en dominio o atresia folicular, puede ser importante para los ovocitos para adquirir competencia de desarrollo (Sirard y col., 1998, Yang y col., 1998, Mermillod y col., 1999, Hendriksen y col., 2000, Fair, 2003, Pictou y col., 2003, Hendriksen y col., 2004, Conti y col., 2012).

Las células del cumulus desempeñan un papel crucial durante la maduración de ovocitos, induciendo a la reanudación de la meiosis y apoyando la maduración citoplasmática (Tanghe y col., 2002, Gilchrist y col., 2004). Los ovocitos inmaduros están rodeados por varias capas de células del cumulus fuertemente adheridas que proporcionan nutrientes y controlan la maduración nuclear y citoplasmática (Chian y col., 1994, Bruynzeel y col., 1997, Krisher, 2004, Krisher, 2013). Hay una compleja interacción entre el ovocito y las células del cumulus durante el crecimiento y desarrollo del folículo, y está mediada por factores de crecimiento y hormonas. Las células del cumulus se comunican por medio de una intrincada red de canales transmembrana conocidas como uniones de hendidura (también llamadas uniones "gap"), mientras que en la capa más interna de células (corona radiata) se extiende procesos citoplásmicos a través de la zona pelúcida para formar uniones comunicantes con el interior del ovocito. La importancia de estos procesos y las uniones comunicantes se comprueba por la impermeabilidad de la membrana del ovocito a varios metabolitos de bajo peso molecular y donde el ingreso de tales moléculas es exclusivamente a través de los procesos celulares de la corona y las uniones gap (Parrish y col., 1992, Vozzi y col., 2001, Thomas y col., 2004). Las células del cumulus también están vinculadas a las células de la granulosa, que a su vez están estrechamente relacionadas con las células de la teca interna (Gilchrist y col., 2004, Albertini, 2015). Todavía no está dilucidado si el reinicio de la meiosis ocurre como consecuencia de la disminución del pasaje de sustancias inhibitoras o por el contrario a través del pasaje al ovocito de sustancias estimuladoras generadas en las células de la granulosa (Parrish y col., 1992, Faerge y col., 2001, Mayes y Sirard, 2001, Matzuk y col., 2002, Mayes y Sirard, 2002, Thomas y col., 2004, Richard, 2007, Bilodeau-Goeseels, 2008). Los estudios demuestran que la presencia de células del cumulus durante la maduración es esencial para la adquisición de la competencia de

desarrollo (Fukui, 1990, Chian y col., 1995, Liu y col., 1995, Konishi y col., 1996, Kim y col., 1997, Hashimoto y col., 1998a, Ikeda y col., 2006). Las células del cumulus serían necesarias e indispensables durante 12 horas del período de IVM para lograr la maduración citoplasmática normal (Chian y col., 1995). También se demostró la importancia de mantener una capa intacta de células de la corona (Hashimoto y col., 1998a). La capacidad de desarrollo *in vitro* de los ovocitos está marcadamente influenciada por el grado de presencia y cantidad de células de la granulosa cumulus durante el período de IVM (Tanghe y col., 2002, Gilchrist y col., 2004, Hussein y col., 2006, Ikeda y col., 2006, Gilchrist y Thompson, 2007, Richard, 2007, Bilodeau-Goeseels, 2008, Sirard, 2011). Sin embargo, los ovocitos aspirados por medio de OPU presentan menor cantidad de células del cumulus en comparación con los recuperados de ovarios de matadero. La suplementación con células de la granulosa durante la maduración de ovocitos con escasa cobertura de células podría mejorar la tasa de producción de blastocistos de manera significativa (Galli y Lazzari, 1995, Galli y Lazzari, 1996, Konishi y col., 1996).

En condiciones *in vitro*, debido a que la extracción del ovocito se produce antes de la descarga de LH, los COCs recuperados se encuentran en un estado inmaduro y requieren ser cultivados para reanudar la primera división meiótica (Edwards, 1965, Thibault y col., 1987, Hyttel y col., 1997). La alteración de las condiciones básicas durante el período de maduración puede afectar significativamente la competencia del ovocito y comprometer su desempeño durante la fertilización y la formación de blastocistos viables (Rose y Bavister, 1992). Las condiciones de cultivo utilizadas desde el inicio de la maduración hasta la culminación del período de cultivo han demostrado influir en la competencia de desarrollo, tasa de producción de blastocistos viables, capacidad de implantación, generación y mantenimiento de preñeces, y la obtención de crías vivas y sanas (Kruip y col., 2000, Niemann y Wrenzycki, 2000, Thompson y Peterson, 2000, Farin y col., 2001, Khosla y col., 2001, Bilodeau-Goeseels y Panich, 2002, Urrego y col., 2014).

Los ovocitos de mamíferos tienen la capacidad de madurar *in vitro* (IVM) y alcanzar el estadio de MII cuando son colectados de folículos ováricos y cultivados en condiciones apropiadas en presencia de hormonas y/o factores de crecimiento por un período de 24 horas (Ball y col., 1984, Thibault y col., 1987, Leibfried-Rutledge y col., 1989, Sirard y Blondin, 1996, Ward y col., 2002, Lonergan y Fair, 2016). Este proceso, puede evaluarse mediante la observación de los cromosomas en la placa metafásica (MII) y la presencia del segundo corpúsculo polar (maduración nuclear) (Motlík y col., 1978, Hyttel y col., 1986b, Hyttel y col., 1987, de Loos y col., 1992, Zhang y col., 1992, De La Fuente, 2006, Liu y col., 2006, Tan y col., 2009). Sin embargo,

la denominada maduración citoplasmática que comprende numerosos eventos moleculares como la síntesis y la fosforilación de proteínas relacionadas con la meiosis, reorganización de organelas, y la formación del pronúcleo femenino que no pueden observarse en el microscopio óptico (Sirard y col., 1989, de Loos y col., 1992, Eppig, 1996, Bevers y col., 1997, Watson, 2007, Sun y col., 2009, Parrish, 2014, Lonergan y Fair, 2016). La alta variabilidad en el estatus de los ovocitos antes de iniciar el proceso de maduración *in vitro* y la asincronía en el tiempo necesario para alcanzar el grado óptimo de maduración nuclear y citoplasmática, explicaría la competencia variable del embrión resultante (Hyttel y col., 1997, Mehlmann, 2005).

Además, durante la maduración las mitocondrias migran hacia una posición perinuclear mientras que los gránulos corticales se desplazan hacia la periferia (ubicándose por debajo del oolema) para ejercer un bloqueo efectivo contra la polispermia durante la penetración y fecundación (Ducibella, 1996, Sun, 2003, Liu, 2011). La maduración citoplasmática puede ser estimada o valorada de forma indirecta, evaluando diferentes parámetros, como la capacidad de formación del pronúcleo masculino, el contenido intracelular de glutatión (GSH), la exocitosis del contenido de los gránulos corticales al espacio perivitelino y el desarrollo embrionario temprano luego de la FIV (Rose y Bavister, 1992, Eppig, 1996, Izadyar y col., 1996, Izadyar y col., 1998a, Combelles y col., 2002, Ferreira y col., 2009).

Durante el proceso de maduración del ovocito es importante la presencia de aminoácidos y componentes energéticos (Sutton y col., 2003), ya que se produce un aumento en la actividad glucolítica con la oxidación de la glucosa y la glutamina (Zuelke y Brackett, 1993) y en el metabolismo oxidativo del piruvato luego de la ruptura de la vesícula germinal (Kim y col., 1993b, Rieger y Loskutoff, 1994, Sutton-McDowall y col., 2010). La presencia de glucosa en bajas concentraciones se vuelve indispensable para mantener el desarrollo competente cuando la maduración *in vitro* se desarrolla en condiciones de alta concentración de oxígeno (Hashimoto y col., 2000a, Hashimoto y col., 2000b, Sutton-McDowall y col., 2010). El aporte de pequeñas cantidades de glucosa resulta en una disminución de las especies reactivas al oxígeno (ROS) e incrementa las concentraciones de GSH (de Matos y Furnus, 2000, de Matos y col., 2002a, Krisher, 2004, Luberdá, 2005). El GSH cumpliría un rol muy importante en la decondensación del núcleo de los espermatozoides y la posterior formación del pronúcleo masculino debido a que, durante la fecundación rompe los puentes disulfuro de la protaminas que empaquetan el material nuclear (Sutovsky y Schatten, 1997). Uno de los mecanismos reguladores de la maduración está relacionado con el AMPc que actúa en la profase I (diplonema). La disminución en su

concentración provoca el cese de la detención de la meiosis mientras que la estimulación de la síntesis de AMPc inhibe la ruptura de la vesícula germinal (Masui, 2001, Sun y col., 2009, Zhang y col., 2009). Otro mecanismo regulador está ligado al nivel intracelular de calcio e involucra a la hormona LH que actúa aumentando los niveles de este ion de dos formas, movilizándolo el calcio libre almacenado en los depósitos intracelulares y estimulando la entrada de calcio a través de los canales que se encuentran en el coeloma (Homa y col., 1993, Homa, 1995, Mattioli y Barboni, 2000, Tosti, 2006, Silvestre y col., 2012, Assidi y col., 2013).

El resultado final de la maduración *in vivo* es la liberación de un ovocito maduro en metafase II del folículo ovulatorio (Sirard y col., 1998, Eppig y col., 2002, Picton y col., 2003, Alberts y col., 2014, Lonergan y Fair, 2016) en cambio, los ovocitos inmaduros recuperados de folículos ováricos en diferentes fases de la onda folicular y momento del ciclo estral, pueden reanudar y completar la meiosis en condiciones *in vitro* independiente de hormonas (Sirard y col., 1989, Rose y Bavister, 1992, Richard y Sirard, 1996, Gilchrist y Thompson, 2007). No obstante, la competencia de desarrollo estaría comprometida o disminuida debido a las bajas tasas de desarrollo embrionario logrados bajo esas circunstancias (Blondin y col., 1995, Gandolfi, 1998, Mermillod y col., 1999). Esta sub-óptima capacidad en progresar en el desarrollo embrionario fue atribuida a una maduración citoplasmática *in vitro* deficiente (Sirard y Blondin, 1996, Sirard y Blondin, 1998, Krisher, 2004, Sirard y Coenen, 2006). La maduración citoplasmática se podría definir como la totalidad de procesos metabólicos, moleculares y ultra-estructurales que acondicionan el citoplasma del ovocito para lograr una fertilización normal (Sirard, 2001, Sirard y col., 2006, Watson, 2007) y la adquisición de la competencia de desarrollo (Hytel y col., 1986a, Hyttel y col., 1986b, Shamsuddin y col., 1993, Duranthon y Renard, 2001). Incluye la síntesis de una amplia gama de proteínas reguladoras del desarrollo del ovocito, la reubicación de organelas y la alteración del sistema de transporte de membrana (Moor y col., 1998, Barnes y Sirard, 2000, Gandolfi y Gandolfi, 2001, Sirard, 2001, Krisher, 2004, Sirard y Coenen, 2006, Sirard y col., 2006, Watson, 2007, Mermillod y col., 2008, Marteil y col., 2009, Bilodeau-Goeseels, 2011). Además de las modificaciones postranscripcionales del ARNm, se deben realizar modificaciones de proteínas, nutrientes y sustratos, acumulados durante la ovogénesis, los cuales son necesarios para lograr la competencia de desarrollo de los ovocitos y alcanzar un desarrollo embrionario óptimo (Sirard y col., 1989, Levesque y Sirard, 1994, Levesque y Sirard, 1995, Mehlmann, 2005, Watson, 2007). A esto se le suma la modificación ultraestructural del complejo de Golgi, la acumulación de ribosomas y el aumento de estructuras reticulares (Kruip y col., 1983, Hyttel y col., 1986b, Fulka y col., 1998). La maduración citoplasmática a menudo se divide en

tres procesos principales: la redistribución de las organelas, la dinámica del citoesqueleto y maduración molecular (Ferreira y col., 2009). Una maduración citoplasmática deficiente o incompleta podría bloquear el desarrollo post-fertilización, la activación del genoma embrionario, la formación de blastocistos e incluso afectar la normal implantación (Führer y col., 1989). Los parámetros morfológicos indirectos usualmente observados para evaluar la maduración citoplasmática son la expansión de las células del cumulus, la extrusión del primer corpúsculo polar y el espacio perivitelino (Kruip y col., 1983). En última instancia, la calidad y la integridad de la maduración citoplasmática juegan un papel importante en la competencia de desarrollo del ovocito (Marteil y col., 2009), en la formación del pronúcleo (Chian y col., 1994, Nagai, 2001), progresión del ciclo celular meiótico a mitótico, y hacia delante, proporciona las condiciones necesarias para la normal implantación, el inicio de la preñez y el desarrollo fetal normal (Eppig, 1996, Moor y col., 1998, Trounson y col., 1998, Gandolfi y Gandolfi, 2001, Mayes y Sirard, 2001, Camargo y col., 2006, Sirard y col., 2006, Marteil y col., 2009).

A medida que progresa el desarrollo folicular, la proporción de ovocitos en condiciones de completar la maduración nuclear y citoplasmática se incrementa (Pavlok y col., 1992, Lonergan y col., 1994b, Eppig, 1996, Eppig y col., 2002). Los ovocitos que sólo completan parcialmente algunos de éstos procesos y que son expuestos a la fertilización y posterior desarrollo embrionario no son capaces de desarrollarse hasta el estadio de blastocisto quedándose detenidos en etapas tempranas del desarrollo (Eppig, 1996, Eppig y col., 2002). Generalmente, ésta situación está asociada o es un indicador de una maduración citoplasmática incompleta, deficiente o defectuosa (Eppig y col., 1994, Fulka y col., 1998). La maduración nuclear y citoplasmática no parecerían estar sincronizadas pero sí interrelacionadas (Sirard y col., 1989, Eppig, 1996, Fulka y col., 1998, Moor y col., 1998, Yang y col., 1998). La finalización de la maduración nuclear en forma aislada de la maduración citoplasmática provoca una incapacidad en el ovocito para sortear la fertilización y el desarrollo embrionario temprano ya que la adquisición de la competencia de desarrollo de manera completa requiere de una interacción muy compleja tanto entre tanto la maduración nuclear y como la citoplasmática (Sirard y col., 1989, Eppig, 1996, Fulka y col., 1998, Moor y col., 1998, Yang y col., 1998, Eppig y col., 2002).

Una estrategia planteada para lograr la sincronización entre la maduración nuclear y la citoplasmática consiste en retrasar la reanudación de la meiosis usando una variedad de inhibidores de la meiosis, y de esa forma continuar con la acumulación de ARNm y proteínas en el ovocito para mejorar la maduración citoplasmática (Bilodeau-Goeseels, 2008, Bilodeau-

Goeseels, 2012, Bilodeau-Goeseels y Magyara, 2012). La estrategia más común consiste en mantener elevados los niveles intra-ovocito de AMPc. La maduración también se puede prevenir mediante sustancias que inhiben la síntesis de proteínas, la fosforilación o aquellos inhibidores que actúan sobre las quinasas dependientes de ciclina. A pesar de que es posible inhibir de forma reversible la reanudación meiótica, la evidencia de un efecto positivo en la competencia de los ovocitos es escasa (Lonergan y Fair, 2016). Las publicaciones más recientes utilizan compuestos farmacológicos que permiten la sincronización de los procesos de maduración nuclear y citoplasmática y prolongan el período de maduración al promover una interacción más larga entre el ovocito inmaduro y las células del cumulus (Gilchrist y Thompson, 2007, Gilchrist y col., 2008, Albuz y col., 2010, Gilchrist, 2010, Gilchrist y col., 2015). El denominado sistema de maduración “fisiológica” de los ovocitos intenta recapitular algunos de los eventos bioquímicos y celulares que se producen de forma natural durante la maduración *in vivo* del ovocitos, con el objetivo de mejorar la eficiencia de la IVM (Albuz y col., 2010). Sin embargo, otros autores no lograron resultados similares y la repetitividad de los hallazgos iniciales fueron cuestionados (Guimaraes y col., 2015). Los autores de la maduración “fisiológica” recocieron inconvenientes y recientemente publicaron una nueva versión del sistema en el que se omite un componente durante la IVM y el tiempo de maduración se extiende ligeramente (Gilchrist y col., 2015).

1.2.1. Factor promotor de la maduración

La reanudación de la meiosis estaría regulada por un componente celular esencial llamado factor promotor de la maduración (FPM) (Wasserman y Masui, 1976, Eppig, 1996, Bevers y col., 1997, Wu y col., 1997, Sirard y col., 1998). El FPM está constituido por una subunidad reguladora llamada ciclina B1 y otra catalítica llamada p34 (Lohka y col., 1988, Fissore y col., 1996, Fan y Sun, 2004, Liang y col., 2007). Esta última, también es conocida como quinasa dependiente de ciclina (CDK) 1 (Doree, 1990, Lewin, 1990, Nurse, 1990). El FPM se activa en el momento de la ruptura de la VG y aumenta hasta alcanzar una meseta al final de la meiosis I. Una disminución transitoria de la actividad del FPM ocurre durante la transición de la meiosis I a la meiosis II, para luego reactivarse rápidamente y mantenerse en un nivel alto durante toda la detención en MII (Doree, 1990, Lewin, 1990, Sirard y col., 1998, Masui, 2001, Schmitt y Nebreda, 2002, Tripathi y col., 2010). La actividad del FPM es controlada por la concentración celular de la ciclina B la cual ingresa a la VG justo antes de su ruptura (Levesque y Sirard, 1996, He y col., 1997, Wu y col., 1997, Porter y Donoghue, 2003, Miyazaki y Arai, 2007). Luego de su entrada, su síntesis aumenta progresivamente alcanzando su máximo nivel al final de la meiosis I. La ciclina se

asocia con la subunidad p34 para formar el complejo activo. La degradación de la ciclina B es necesaria para la extrusión del cuerpo polar (Eppig, 1996, Levesque y Sirard, 1996, Porter y Donoghue, 2003, Miyazaki y Arai, 2007, Liu y col., 2012). Luego de la ruptura de la vesícula germinal aparece un factor citostático que controla la detención en MII y alcanza su concentración máxima cuando el ovocito llega a esta etapa (Nishiyama y col., 2010). El factor citostático es muy sensible a los iones calcio y actúa inhibiendo la proteólisis de la ciclina (Doree, 1990, Liu y col., 1998, Masui, 2001). Mientras la ciclina no es degradada, el FPM permanece activo. Además de los procesos de fosforilación y desfosforilación hay otros factores que actúan en la activación del FPM, como la disminución en la concentración de AMPc que precede a la ruptura de la vesícula germinal (Eppig y Downs, 1984, Aktas y col., 1995, Thomas y col., 2002, Luciano y col., 2004, Thomas y col., 2004). El pico de LH afecta la comunicación en las uniones gap entre el ovocito y las células foliculares lo cual impide el ingreso de AMPc (Zhang y col., 2007, Zhang y col., 2009, Zhang y Xia, 2012). La falta de AMPc origina la detención de la meiosis mientras los ovocitos están rodeados por las células foliculares (Eppig y Downs, 1984, Aktas y col., 1995, Sirard y col., 1998, Luciano y col., 2004, Thomas y col., 2004, Sun y col., 2009). Además, en respuesta a la LH se produce la liberación de iones calcio de los depósitos endógenos de las células foliculares, lo que contribuye a la ruptura de la vesícula germinal (Canipari, 2000, Mehlmann, 2005, Landim-Alvarenga y Maziero, 2014).

Otra proteína quinasa importante en la regulación del ciclo celular meiótico es la MAP quinasa, la cual fosforila proteínas cromosómicas importantes para mantener a la cromatina en un estado condensado durante la transición de meiosis I a meiosis II y prevenir la formación de la envoltura nuclear por la fosforilación de las láminas nucleares (Fissore y col., 1996, Motlik y col., 1998, Liu y Yang, 1999, Sun y col., 2002, Tomek y col., 2002, Fan y Sun, 2004).

1.2.2. Medio de IVM y suplementos

El medio más común utilizado en la maduración de ovocitos bovinos es el TCM-199 (Tissue Culture Medium-199), compuesto por sales Earle's con buffer bicarbonato, piruvato, lactato, vitaminas, aminoácidos, purinas y proteínas (albúmina bovina o suero) (Lonergan y col., 1994a, Choi y col., 2001).

Entre los suplementos más estudiados figura la adición del suero y sus efectos sobre ovocitos y embriones (Bavister y col., 1992, Massip y col., 1995, Walker y col., 1996, Van Langendonck y

col., 1997, Thompson y col., 1998, Young y col., 1998, Hansen y col., 2010). Usualmente se agrega suero bovino y/o albúmina sérica bovina (BSA) como fuente de proteínas a los medios de maduración y cultivo embrionario (Wang y col., 1997). El suero constituye la fracción líquida resultante del proceso de coagulación sanguínea y su composición química y efectividad depende en gran medida de su origen (suero fetal bovino, suero de animal adulto, suero de vaca en estro) y de la partida de elaboración (Pinyopummintr y Bavister, 1994).

La albúmina es una proteína plasmática de carácter ácido, soluble en agua, con un peso molecular aproximado de 69.000, y constituye uno de los componentes más importantes del suero sanguíneo (Mucci y col., 2006b). Su pureza y calidad también puede variar entre lotes y afectar el rendimiento de los ovocitos y embriones durante las etapas de cultivo (Leibfried-Rutledge y col., 1986, Fukui y col., 1991, Eckert y Niemann, 1995, Rizos y col., 2003, Seidel, 2006).

Entre los efectos benéficos que justifican la utilización del suero y la albúmina podemos encontrar los siguientes: reducir potenciales cambios de pH gracias a su capacidad buffer, proteger a los embriones en cultivo de sustancias tóxicas y aportar factores de crecimiento y hormonas gonadotróficas (Sirard y First, 1988, Armstrong y col., 1991, Eckert y Niemann, 1995, Keskinetepe y Brackett, 1996, Wang y col., 1997, Thompson y col., 1998, Holm y col., 1999, Ali y Sirard, 2002a, Rizos y col., 2003, Seidel, 2006). El suero empleado en la suplementación de los medios de maduración mejora la calidad de los ovocitos y permite obtener satisfactorias tasas de desarrollo (Lonergan, 1994, Lonergan y col., 1994a). Inicialmente, la concentración de suero utilizado durante el período de cultivo era alta (>10% v/v) producto esencialmente de alimentar a las células soporte del co-cultivo (Goto y col., 1992, Catt, 1994, Menck y col., 1997). Luego se redujo al 5% v/v sin co-cultivo (Holm y col., 1999) continuándose esta tendencia a la baja hasta el actual 2-3% v/v utilizado principalmente para mantener una alta productividad de blastocistos sin sacrificar calidad embrionaria (Leivas y col., 2011).

Algunos efectos negativos que han sido atribuidos al uso de suero en los medios de IVM son: alteraciones mitocondriales, aumentos de lípidos, alteraciones en la síntesis proteica, disminución del número de complejos de unión o gap, entre otros (Pinyopummintr y Bavister, 1991, Saeki y col., 1991, Bavister y col., 1992, Rose y Bavister, 1992, Eckert y Niemann, 1995, Keskinetepe y col., 1995, Gliedt y col., 1996, Gandhi y col., 2000, Imai y col., 2002, Abe y Hoshi, 2003, Rizos y col., 2003, Seidel, 2006).

Debido al importante rol que desempeñan las hormonas gonadotróficas (FSH y LH, principalmente) en el desarrollo folicular y del ovocito *in vivo*, y al hecho de que los ovocitos son extraídos antes de producirse el mecanismo disparador de la continuación de la meiosis, la FSH y LH se agregan al medio de maduración IVM (Leibfried-Rutledge y col., 1989, Younis y col., 1989, Zuelke y Brackett, 1990, Armstrong y col., 1991, Van Soom y de Kruif, 1996, Bevers y col., 1997, Izadyar y col., 1998b, Choi y col., 2001). En general, los COCs se recuperan de folículos antrales de ovarios no estimulados. Estos folículos están a varios días de alcanzar el tamaño preovulatorio óptimo y por lo tanto pueden no haber recibido la suficiente exposición a las hormonas y factores de crecimiento necesarios y de esa forma disponer la cantidad de ARNm mínima para lograr un desarrollo *in vitro* aceptable (Choi y col., 2001, Calder y col., 2005, Bettegowda y Smith, 2007, Maddox-Hyttel y col., 2007). El agregado de ambas gonadotrofinas puede ser voluntaria o involuntaria ya que al tratarse de preparaciones provenientes de extractos hipofisarios, la contaminación con la otra gonadotrofina es casi inevitable. Las gonadotrofinas aumentarían la capacidad de desarrollo de ovocitos madurados en medios libres de suero (Saeki y col., 1990, Saeki y col., 1991). Las condiciones de maduración (ovocitos madurados *in vivo* o *in vitro*) tiene una influencia significativa en la tasa de desarrollo embrionario (Rizos y col., 2008). Aunque una alta proporción de los ovocitos colectados alcanzarán la maduración nuclear de manera espontánea (Sirard y col., 1988), las gonadotrofinas se agregan al medio de maduración para inducir la maduración nuclear y citoplasmática, la expansión del cumulus y para mejorar el desarrollo embrionario (Picton y col., 2003, Maddox-Hyttel y col., 2005, van den Hurk y Zhao, 2005, Sirard, 2011, Adhikari y Liu, 2014, Lonergan y Fair, 2016). La hormona folículo estimulante (FSH) induce la expansión de las células cumulus (Younis y col., 1989, Sutton-McDowall y col., 2004) y junto con la hormona luteinizante (LH), mejora la tasa de fertilización y divaje (Zuelke y Brackett, 1990, Izadyar y col., 1998a). En la mayoría de los casos, las concentraciones de gonadotrofinas se añaden en exceso al medio de maduración *in vitro* y no está claro si son estrictamente necesarias concentraciones tan altas de FSH y LH. La FSH porcina se suele añadir al medio de IVM con una concentración de 0.5-1 $\mu\text{g/ml}$ (Sirard y First, 1988), pero hasta 10 $\mu\text{g/ml}$ se ha utilizado siendo que la concentración de FSH en el momento preovulatorio es de aproximadamente 125 ng/ml (Ireland y Roche, 1982, Spicer y Echtenkamp, 1986). La LH ovina se suele añadir al medio de maduración a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$, pero los niveles promedio de LH preovulatoria ronda los 200 ng/ml (Ireland y Roche, 1982, Spicer y Echtenkamp, 1986). Las gonadotrofinas recombinantes son una alternativa a las hormonas hipofisarias o urinarias ya que son fuentes altamente purificadas de la hormona y que pueden

permitir la investigación específica de los roles individuales de FSH y LH sin contaminación cruzada.

Para que las gonadotropinas actúen *in vitro* los receptores a FSH y LH en el COC deben estar presentes y expresarse. En el caso de la FSH existe evidencia de la existencia de receptores (Chen y col., 1994, van Tol y col., 1996) mientras que el caso de LH es más controversial (Peng y col., 1991, van Tol y col., 1996). La función reproductora femenina de los mamíferos está finamente regulada por un conjunto de señales endócrinas coordinadas que permiten el desarrollo de los ovocitos competentes, la ovulación, la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (Webb y col., 1992, Hunter y col., 2004, Adams y col., 2008, Aerts y Bols, 2010b, Assidi y col., 2013, Assidi y Sirard, 2013, Adams y Singh, 2014, Albertini, 2015). Las gonadotropinas (principalmente FSH y LH) son los principales factores endocrinos extra-ováricos implicados en el control de estas funciones en el ovario (Eppig, 1980, Hillier, 1994, Richards, 1994, Howles, 2000, Richards y Pangas, 2010, Sha y col., 2010). La liberación de estas dos hormonas de la glándula pituitaria se rige a través del hipotálamo por acción de la GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas) y es modulada por factores ováricos como la activina y la inhibina (Gregory y Kaiser, 2004). Después de la fase no-dependiente o receptiva a la acción de gonadotropinas, el crecimiento folicular se convierte primero FSH-dependiente y luego LH-dependiente antes de la ovulación (Hillier y col., 1994, Kumar y col., 1997, Ginther, 2000, Ginther y col., 2000, Howles, 2000, Hunter, 2003, Zeleznik, 2004). Mientras que la FSH se centra principalmente en el crecimiento folicular, la proliferación celular y la producción de estrógenos, LH induce la biosíntesis de andrógenos, la maduración final del ovocito y la ovulación (Wise y col., 1994, Howles, 2000, Mattioli y Barboni, 2000, Shimada y Terada, 2002, Accardo y col., 2004, Sirard y col., 2007, Panigone y col., 2008).

La FSH mejora la maduración de los ovocitos (tanto nucleares y citoplasmáticas), la expansión de las células del cumulus, la tasa de fertilización y el desarrollo embrionario temprano en varias especies de mamíferos incluyendo el bovino (van Tol y col., 1996, Ali y Sirard, 2002b, Nivet y col., 2012), ratón (Adriaens y col., 2004), cerdo (Ye y col., 2005, Wu y col., 2007, Sasseville y col., 2009) y humanos (Berkkanoglu y col., 2007, Hillier, 2009, Yan y col., 2011). El receptor a FSH se expresaría en las células de la granulosa y cumulus desde la etapa de folículo secundario en la mayoría de los mamíferos, incluyendo ratones, cerdos, ovejas, vacas y seres humanos (Salustri y col., 1989, Merriman y col., 1998, Anderiesz y col., 2000, Accardo y col., 2004, Ali y Sirard, 2005, Ye y col., 2005). Durante el período preovulatorio, la FSH domina el

control del crecimiento folicular mientras que al momento de la ovulación, la LH toma un rol central tanto en el bovino como en humanos (O'Herlihy y col., 1980, World y col., 1980, Zafeiriou y col., 2000, Blondin y col., 2002, Dieleman y col., 2002, Baerwald y col., 2009). Asumiendo que los receptores de LH están ausentes en las células del cumulus (Amsterdam y col., 1975, van Tol y col., 1996, Nuttinck y col., 2004), la FSH ha sido la principal gonadotropina utilizada en IVM para desencadenar la maduración de los ovocitos (Leibfried-Rutledge y col., 1989, Sirard y Blondin, 1996, Ali y Sirard, 2002b, Picton y col., 2003, Sirard y col., 2007, Landim-Alvarenga y Maziero, 2014, Lonergan y Fair, 2016).

Para ser efectiva la LH depende de la expresión y funcionalidad del receptor a LH en el folículo. La expresión de este receptor ha sido reportada en la teca y células de la granulosa (Camp y col., 1991, Robert y col., 2003, Park y col., 2004), pero estaría ausente tanto en el ovocito como en las células del cumulus (Amsterdam y col., 1975, van Tol y col., 1996, Nuttinck y col., 2004). Se ha propuesto recientemente que el efecto de inducción meiótica de la LH sobre las células del cumulus estaría mediada indirectamente a través de los factores de crecimiento tipo EGF (Park y col., 2004, Panigone y col., 2008, Zhang y col., 2009, Reizel y col., 2010). Por lo tanto no sería necesaria la adición de LH en los medios IVM (Anderiesz y col., 2000, Choi y col., 2001, Ali y Sirard, 2002b). Sin embargo se han reportado trabajos donde informan la expresión del receptor a LH en células del cumulus en ratas, cerdos, y humanos (Peng y col., 1991, Shimada y col., 2003, Kawashima y col., 2008, Jeppesen y col., 2012) señalando cierta controversia en el tema (Assidi y col., 2013).

Hoy existe la posibilidad de utilizar FSH y LH recombinante. Estas hormonas son producidas por ingeniería genética avanzada y entre sus principales ventajas se pueden mencionar la pureza y riesgo sanitario mínimo (Bergh, 1999, Agrawal y col., 2000). Los resultados utilizando FSH recombinante humana (rhFSH) no muestran una ventaja significativa respecto de la hormona pituitaria (Bever y col., 1997) con excepción de medios de maduración libres de suero (Calder y col., 2003).

Uno de los cambios más visibles de la maduración *in vitro* es la expansión de las células del cumulus. Además de multiplicar su área de cobertura, el cumulus produce sustancias adherentes que permite que el ovocito sea atrapado por las fimbrias del oviducto e interaccione con el espermatozoide durante la penetración en el momento de la fecundación (Tanghe y col., 2002, Van Soom y col., 2002, Tanghe y col., 2003).

Durante el período de maduración el estrés oxidativo puede transformarse en daño o perjuicio para el ovocito cuando se produce un desequilibrio entre los factores pro-oxidantes y las defensas antioxidantes (Balaban y col., 2005, Agarwal y col., 2012). Los efectos adversos del estrés oxidativo sobre calidad del ovocito y su apropiado funcionamiento pueden producir fragmentación en el ADN, oxidación de proteínas y la peroxidación de lípidos (Dalvit y col., 2005b, Furnus y col., 2008, Morado y col., 2009, Pandey y col., 2010). La síntesis de glutatión (GSH) durante la maduración *in vitro* tendría un papel importante sobre el desarrollo del embrión ya que protegería al ovocito del daño oxidativo (Lord y Aitken, 2013, Tsunoda y col., 2013). El aumento de las concentraciones de GSH durante IVM en ovocitos bovinos mejoró el desarrollo embrionario (de Matos y col., 1995, Miyamura y col., 1995, de Matos y col., 1996, Furnus y col., 1998). El daño oxidativo causado por las especies reactivas al oxígeno (ROS) son altamente reactivas e inestables. Ellas pueden reaccionar con ácidos nucleicos, lípidos, proteínas, hidratos de carbono para adquirir un electrón y recuperar la estabilidad. Estas reacciones inducen una cascada de sucesos posteriores en cadena que finalmente, pueden resultar en daño celular (de Lamirande y Gagnon, 1994, Ford, 2004, Agarwal y col., 2006b, Agarwal y col., 2012). Las ROS están implicadas en una amplia gama de disfunciones reproductivas incluyendo la maduración de ovocitos, la esteroidogénesis, la función del cuerpo lúteo, y la capacitación e hiperactivación espermática (Rueda y col., 1995, Aitken, 2000, Behrman y col., 2001, Agarwal y col., 2005, Agarwal y col., 2006a, Ruder y col., 2008, Sordillo y Aitken, 2009, Pandey y col., 2010, Tsunoda y col., 2013). En concreto, las ROS pueden causar roturas en cadena de ADN (Takahashi y col., 2000, Wei y Lee, 2002, Combelles y col., 2009), inducir apoptosis en los ovocitos y durante el desarrollo embrionario temprano (Tatemoto y col., 2000, Guerin y col., 2001, Zhang y col., 2006, Jančar y col., 2007, Ryter y col., 2007) o provocar el envejecimiento del ovocito (Tarin, 1996, Fissore y col., 2002, Goud y col., 2008, Tatone y col., 2008, Lord y Aitken, 2013). Bajo condiciones de cultivo *in vitro*, los sistemas anti-oxidantes pueden atenuar los efectos deletéreos del estrés oxidativo causado por ROS (Del Corso y col., 1994, Pompella y col., 2003, Trachootham y col., 2008). Los tioles como la cisteína, b-mercaptoetanol o cisteamina han demostrado ser efectivos como sistemas anti-oxidantes y tener efectos beneficiosos en la viabilidad de los ovocitos y mantener, e incluso mejorar, las diversas funciones de sus células (de Matos y col., 2002b, Ali y col., 2003). El agregado de tioles al medio de maduración aumenta los niveles de GSH intracelular durante la maduración de ovocitos bovinos (de Matos y col., 1995, de Matos y col., 1996, de Matos y col., 1997, Caamaño y col., 1998, de Matos y Furnus, 2000, de Matos y col., 2002a, Ali y col., 2003, Furnus y col., 2008, Deleuze y Goudet, 2010). La

concentración de GSH está altamente correlacionada con la presencia y cantidad de células del cumulus (Caamaño y col., 1998, Cetica y col., 2001, de Matos y col., 2002b, Tanghe y col., 2002, Fatehi y col., 2005, Lubberda, 2005, Maedomari y col., 2007) y el contenido de GSH aumenta durante el transcurso del período de maduración alcanzado el pico en la etapa de metafase II para luego caer durante rápidamente en los estadios embrionarios tempranos (Harvey y col., 2002, Lubberda, 2005, Takahashi, 2012).

1.2.3. Tensión de oxígeno durante IVM, FIV y IVC

En el bovino, las condiciones atmosféricas en IVM más utilizada es 5% de CO₂ en aire (20% de oxígeno), siendo que la tensión de oxígeno es más baja tanto en el tracto reproductivo femenino (Fischer y Bavister, 1993, Bavister, 1995) como también en el folículo antral (Redding y col., 2008, Thompson y col., 2015). Durante el cultivo embrionario, especialmente en condiciones libres de células soporte (co-cultivo), la concentración de oxígeno de 5-7% sería óptima (Thompson y col., 1990, Takahashi y col., 1996, Olson y Seidel, 2000). Este consenso no ha sido totalmente alcanzado para el bovino donde ciertos reportes demuestran efectos beneficiosos bajo condiciones de baja tensión de oxígeno durante la IVM (Hashimoto y col., 2000a, Kruij y col., 2000, Leivas y col., 2006, Bermejo-Alvarez y col., 2010b) y otros efectos perjudiciales (Pinyopummintr y Bavister, 1995, Watson, 2000, de Castro e Paula y Hansen, 2007). Durante la fertilización, la tensión de oxígeno ha mostrado efectos positivos (Takahashi y Kanagawa, 1998) como negativos (Pinyopummintr y Bavister, 1995, Bermejo-Alvarez y col., 2010b). El metabolismo de la glucosa durante la IVM está ligado a la tensión de oxígeno y generación de ROS. El estrés oxidativo excesivo impacta negativamente en la capacidad de desarrollo de ovocitos y embriones (Johnson y Nasr-Esfahani, 1994, Guerin y col., 2001). En condiciones de alta tensión de oxígeno durante la IVM es necesario una baja concentración de glucosa para mantener la competencia del desarrollo (Hashimoto y col., 2000b). Una baja concentración de glucosa favorece la disminución de ROS y aumenta el GSH, mientras que una alta concentración de glucosa puede inhibir las enzimas responsables de la síntesis de GSH, lo que puede afectar la capacidad de los ovocitos para reducir los niveles de ROS (Hashimoto y col., 2000b). La baja tensión de oxígeno durante la maduración *in vitro* de los ovocitos bovinos sería beneficiosa debido a la disminución de los ROS, principalmente (Krisner, 2004). Si bien la producción de ATP y la progresión a metafase II se inhiben en un ambiente con bajo oxígeno, la generación de ATP a través de la glucólisis y la proporción de ovocitos que alcanza MII aumenta cuando se agrega glucosa (Hashimoto y col., 2000b).

Los sistemas de co-cultivo con células somáticas, tales como células del oviducto o células de granulosa (Lim y Hansel, 1998, Pegoraro y col., 1998), y sistemas de cultivo libres de células como el SOF suplementado con FCS (Holm y col., 1999, Krisher y col., 1999), producen porcentajes de desarrollo de embriones similares. Estos dos sistemas difieren también en la tensión de oxígeno bajo la cual se cultivan los embriones: 20% de O₂ durante el cultivo en condiciones de co-cultivo, mientras que 5% de O₂ se utiliza en condiciones de cultivo libre de células. Cuando los embriones se cultivan en ausencia de células somáticas, altas tensiones de oxígeno pueden afectar negativamente el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos (Fukui y col., 1991). Se ha propuesto que las células somáticas, durante el co-cultivo, disminuyen la tensión de oxígeno en la zona adyacente al embrión (Bavister, 1988) y de esta forma ayudan a mitigar el efecto negativo de la alta tensión de oxígeno (Eppig y Wigglesworth, 1995).

1.3. Fecundación *in vitro* (FIV)

La fecundación consiste en una serie programada de eventos complejos que protagonizan las gametas masculina y femenina. Se inicia con la fusión de las membranas plasmáticas del espermatozoide y del ovocito y finaliza con la formación del cigoto. Sólo los ovocitos que han madurado (maduración meiótica y citoplasmática) pueden ser fecundados y desarrollarse normalmente hasta el estadio preimplantacional de blastocisto (Parrish y First, 1991, Sirard y Blondin, 1996). La fecundación *in vitro* transcurre entre 18 y 24 horas luego de iniciada la IVM donde los ovocitos “maduros” son co-cultivados con espermatozoides capacitados a los fines de lograr la penetración de la zona pelúcida y la fusión del espermatozoide y el ovocito (Brackett, 1973, Brackett y col., 1978, Brackett y col., 1980, Brackett, 1985, First y Parrish, 1987, Greve y Madison, 1991, Kato y Iritani, 1993, Bavister, 2002, Hasler y Barfield, 2014)

Para una fertilización exitosa se requiere de espermatozoides y ovocitos con todas sus funciones intactas y competentes, como también condiciones de incubación compatibles con sus actividades y funciones biológicas (Parrish y First, 1991, Wassarman, 1994). “*In vivo*”, el tracto reproductivo de la hembra provee estas condiciones mientras que “*in vitro*”, se intenta imitar este ambiente utilizando medios de fertilización y factores capacitantes (Byrd, 1981, Wright y Bondioli, 1981, Chang, 1984, Dalvit y col., 1995, Baldi y col., 2000, Wassarman y col., 2001). El medio de fertilización más utilizado actualmente, no replica las condiciones “*in vivo*” de manera efectiva (Parrish y col., 1986, Parrish y col., 1999).

La formulación de un medio de fertilización debe ser capaz de proporcionar el entorno y condiciones necesarias para favorecer/maximizar la penetración de cada ovocito maduro por un espermatozoide capacitado. Además, debe contener ingredientes que además de sostener la normal actividad metabólica de las gametas, deben promover la motilidad espermática, capacitación, la unión de las gametas y el inicio del desarrollo embrionario temprano (Ball y col., 1983, Gordon, 2003e). Varios componentes químicos incluyendo la heparina (Parrish y col., 1988, Mendes y col., 2003), cafeína (Coscioni y col., 2001), cafeína más heparina (Niwa y Ohgoda, 1988, Park y col., 1989b, Tajik y Niwa, 1998), glucosa (Urner y Sakkas, 1996), calcio (Byrd, 1981, Parrish y col., 1999, Coscioni y col., 2001), bicarbonato (Lee y Storey, 1986, Boatman y Robbins, 1991, Suzuki y col., 1994, Tajik y col., 1994) e inositol (Kline y Kline, 1994, Ho y Suarez, 2001c) han resultado ser indispensables para lograr una fertilización exitosa. Medios “simples” con alta carga iónica (“hipertonicos”), como el Brackett y Oliphant (BO) (Brackett y Oliphant, 1975a), TALP-FIV (tyrode's albumin lactate pyruvate medium) (Parrish y col., 1986, Parrish y col., 1999) y más recientemente el SOF-FIV (Gandhi y col., 2000, Ferré y col., 2013) y el M199-FIV (Nedambale y col., 2006a) han sido ampliamente utilizados para lavar semen congelado y fecundar ovocitos *in vitro*. Entre las diferencias más notorias se encuentra el tiempo de fertilización. El TALP-FIV y SOF-FIV requieren >10 hs mientras que el BO demanda 5-6 hs como máximo (Brackett y Oliphant, 1975a, Ward y col., 2002).

El medio TALP es una preparación Tyrode modificada que contiene 25 mM de bicarbonato de sodio y albúmina sérica (0,6% w/v). El medio Tyrode/albumina (TA) se modifica adicionalmente con cantidades variables de fuentes de energía como el lactato de sodio y piruvato (LP). Las concentraciones óptimas de estas fuentes de energía son 10 mM lactato y 1,0 mM piruvato en presencia de 5,6 mM de glucosa, 285-295 mOsm de osmolaridad. Cuando se utiliza TALP como el medio de la fertilización, BSA se emplea como fuente proteica. Algunos estudios han demostrado que la suplementación proteica no sería esencial cuando los ovocitos están rodeados por células del cumulus, pero es esencial cuando los ovocitos están libres de cumulus (Tajik y col., 1993, Saeki y col., 1994). Una alternativa al medio TALP como medio de fertilización es el SOF (Lazzari y col., 1999, Tervit y Pugh, 2000). Comparaciones entre el TALP y SOF revelaron que la calidad de los embriones producidos a día 7 fue significativamente superior en el medio FIV SOF suplementado con aminoácidos esenciales (EAA), aminoácidos no esenciales (NEAA), glutamina y glicina (Lazzari y col., 1999). El medio FIV SOF sin glucosa resultó ser más

adecuado que el TALP y que la suplementación con aminoácidos al medio había mejorado la calidad de los embriones (Lazzari y col., 1999).

La fecundación implica un aumento transitorio en la concentración intracelular de Ca^{2+} libre en los ovocitos, que comienza con la liberación de Ca^{2+} a partir del sitio de unión con el espermatozoide. La fecundación estaría controlada principalmente por la interacción entre el espermatozoide y componentes del ovocito. El ovocito y las moléculas de adhesión en la superficie del espermatozoide regulan el proceso de fecundación (Kopf y col., 1990, Wassarman, 1994, Töpfer-Petersen y col., 2000, Brewis y col., 2005). El espermatozoide debe someterse a un evento de exocitosis antes de que pueda fecundar el ovocito. El mecanismo implicado en la unión espermatozoide-ovocito se basa en la interacción de las proteínas y carbohidratos presentes en la superficie de los gametas (Primakoff y Myles, 2002, Talbot y col., 2003). La fecundación marca el inicio de la transición del ovocito a embrión y el estímulo para la activación del ovocito originado por un aumento en la concentración de calcio intracelular liberado de las reservas intracelulares en el retículo endoplasmático (Snell y White, 1996, Talbot y col., 2003, Kaji y Kudo, 2004, Wassarman y col., 2005). El calcio es un segundo mensajero empleado por una variedad de células para transmitir señales generadas por diversos factores (Stricker, 1999, Swann y Parrington, 1999, Ciapa y Chiri, 2000, Williams, 2002, Malcuit y col., 2006, Whitaker, 2006, Whitaker, 2008, Wakai y col., 2011, Kashir y col., 2014). El calcio típicamente lleva a cabo su papel de señalización en la forma de liberaciones muy cortas (picos) mediante un aumento de la concentración de calcio libre intracitoplasmática y que se repiten periódicamente (oscilaciones de calcio) (Ciapa y Chiri, 2000, Malcuit y col., 2006). En los ovocitos, las oscilaciones de calcio se producen durante la maduración meiótica y en la fertilización, y desencadenan su activación; mientras que después de la fertilización, las oscilaciones continuarán hasta la formación del pronúcleo (Williams, 2002, Kaji y Kudo, 2004, Tosti, 2006, Kashir y col., 2014). Sobre la base de que el espermatozoide absorbe calcio durante su período de capacitación, se propone que es el espermatozoide quien sería responsable de inyectar calcio o de mediar la entrada de calcio en el ovocito (Homa, 1995). En la primera opción, el espermatozoide actuaría como hormona uniéndose a los receptores específicos de la membrana plasmática de los ovocitos; mientras que en la segunda teoría, el espermatozoide desencadenaría la liberación de calcio luego de la fusión con el ovocito y luego introduciéndolo directamente en el ooplasma (Ciapa y Chiri, 2000, Töpfer-Petersen y col., 2000, Evans, 2002, Primakoff y Myles, 2002, Williams, 2002, Gadella y Evans, 2011, Kashir y col., 2014).

La fecundación implica la activación del ovocito por el espermatozoide; sin este estímulo, el ovocito incapaz de formar los pronúcleos y convertirse en un cigoto. Una característica notable de la activación es que el vitelo se reduce en volumen, expulsando fluido en el espacio perivitelino. Al mismo tiempo, la cabeza del espermatozoide se transforma en el pronúcleo masculino. La transformación del núcleo del espermatozoide implica la disolución de la envoltura nuclear y la descondensación de la cromatina en el ooplasma. Los cambios morfológicos que experimenta el espermatozoide durante la transformación en el pronúcleo masculino son: 1) descondensación del núcleo del espermatozoide; 2) re-condensación del núcleo del espermatozoide; 3) re-descondensación del núcleo del espermatozoide; 4) formación del pre-pronúcleo; y 5) pronúcleo masculino (Collas y Poccia, 1998, Chian y col., 1999).

Luego de la reacción acrosómica (RA) el espermatozoide pierde el contenido acrosomal quedando expuesta la membrana acrosomal interna. Ésta se encuentra fusionada a la membrana plasmática de la región posacrosomal de la cabeza del espermatozoide, formando el segmento ecuatorial. Es por este segmento, donde comienza la fusión de las membranas plasmáticas entre ambas gametas (Elder y col., 2010). Una vez atravesada la zona pellúcida (ZP) el espermatozoide alcanza el espacio perivitelino. La penetración de la ZP es el resultado de la acción coordinada de las enzimas acrosomales liberadas en la RA y la fuerza de empuje desarrollada por el movimiento del espermatozoide, que agita la cola de lado a lado y la cabeza de adelante a atrás (Töpfer-Petersen y col., 2000, Wassarman y col., 2004, Elder y col., 2010, Gadella, 2010, Gadella y Evans, 2011). Una vez en el espacio perivitelino, la membrana plasmática del espermatozoide se une al coeloma. La fusión, que primeramente involucra solo a la cabeza del espermatozoide, en algunos mamíferos continúa hasta la incorporación del cuerpo completo del espermatozoide dentro del citoplasma del ovocito (Elder y col., 2010). Las mitocondrias presentes en la cola del espermatozoide son degradadas y sólo las mitocondrias maternas pasarán a la siguiente generación (Cummins, 2000, Luo y col., 2013, Sato y Sato, 2013). En este momento los gránulos corticales se fusionan con la membrana plasmática del ovocito liberando su contenido dentro del espacio perivitelino. Las enzimas hidrolíticas y glicoproteínas liberadas modifican las características fisicoquímicas de la ZP evitando la entrada de nuevos espermatozoides y por lo tanto la polispermia. A este proceso se lo conoce como reacción cortical o de zona. Al mismo tiempo, la membrana plasmática del cigoto se convierte en un mosaico formado por las membranas de los gránulos corticales y la membrana plasmática original. Además, se genera un fuerte endurecimiento de la zona pelúcida (Katska y col., 1989, Coy y col., 2008b, Canovas y col., 2009, Papi y col., 2010, Liu, 2011). El endurecimiento de la ZP

parecería tener como objeto contribuir en el bloqueo a la polispermia y de esa forma evitar la penetración de varios espermatozoides (Katska y col., 1989, Coy y col., 2002, Coy y col., 2008b, Canovas y col., 2009, Papi y col., 2010). La polispermia es un problema común de la FIV en muchas especies (Wang y col., 2003, Tsaadon y col., 2006, Dale y DeFelice, 2011), presentándose en el porcino con una frecuencia mayor (Abeydeera, 2002, Coy y Romar, 2002, Funahashi, 2003, Suzuki y col., 2003) en comparación al bovino (Fukui y col., 1991, Papi y col., 2012) o al humano (van der Ven y col., 1985, Balakier, 1993, Aoki y col., 2005). Los niveles máximos de polispermia reportados después de la fecundación *in vitro* llegan al 50% en el caso del cerdo y 25% para el bovino (Coy y col., 2008b). Si bien el endurecimiento de la ZP después de la fecundación parecería ser un evento común en los mamíferos (Sun, 2003), otros estudios muestran que los ovocitos porcino y bovino fecundados no presentan el endurecimiento de la ZP (Coy y col., 2002, Coy y Romar, 2002, Coy y col., 2005, Coy y col., 2008b). Uno de los mecanismos propuestos para bloquear la polispermia es un aumento de la resistencia de la ZP a la digestión proteolítica como consecuencia de la exocitosis de gránulos corticales que se produce poco después de la fertilización. Sin embargo, parecería que la ZP de los ovocitos de cerdo y bovino se endurece antes de la fecundación. Por tal motivo se especula que tal endurecimiento ZP pre-fertilización podría estar implicado en el control de polispermia, y su falta en los ovocitos madurados *in vitro* podría ser una de las razones del incremento en la polispermia post-fecundación (Coy y col., 2008a, Coy y col., 2008b, Coy y Aviles, 2010).

La polispermia (la penetración del citoplasma de ovocito por más de una espermatozoides) es una condición patológica que usualmente causa la muerte temprana del embrión (Hunter, 1991). Aunque la prevalencia de la polispermia en condiciones *in vitro* es moderada/baja, en los sistemas FIV sigue siendo un obstáculo importante ya no siempre es factible de detectarla a tiempo produciendo pérdidas económicas importantes sobre todo cuando embriones con alguna anomalía son transferidos (Wang y col., 2003, Tsaadon y col., 2006, Coy y col., 2008a, Dale y DeFelice, 2011). La entrada del espermatozoide en el citoplasma del ovocito induce la liberación de los contenidos de los gránulos corticales, que modifican la membrana vitelina, la zona pelúcida (ZP), o ambos, haciéndola refractaria a la entrada de otro espermatozoide (Hoodbhoy y Talbot, 1994, Raz y Shalgi, 1998, Liu, 2011, Papi y col., 2012) y finalizando con cambios en las propiedades mecánicas y la resistencia de la ZP a la proteasa (Yu y col., 2003, Papi y col., 2010). Sin embargo, si bien existen grandes similitudes en los mecanismos de fecundación entre roedores y ungulados, observaciones en ovocitos porcinos y bovinos ovocitos no fecundados, muestran que la resistencia a ZP pronasa dura desde horas hasta días (Katska y col., 1989,

Katska y col., 1999, Kolbe y Holtz, 2005, Coy y col., 2008b), en contraste con la resistencia que exhibe la ZP de ovocitos de ratón o hámster antes de la fertilización (de segundos a minutos) (Gulyas y Yuan, 1985, Yang y Yanagimachi, 1989). De esta manera la ZP de ovocitos en ungulados podría estar sometida a modificaciones durante el tránsito en el oviducto (antes de la fertilización) que afectan su resistencia a la digestión con pronasa y por lo tanto su interacción con el espermatozoide (Kim y col., 1996, Coy y col., 2002, Coy y col., 2005, Coy y col., 2008b). Esto podría representar un mecanismo adicional para controlar la polispermia, diferente a los cambios producidos o inducidos por la reacción cortical. Esto se apoyaría en la opinión de que los espermatozoides necesitarían para penetrar la ZP, al menos en parte, del empuje físico (Bedford, 2004), y sólo aquellos con la capacidad (o la fuerza) de cruzar la ZP endurecida (resistente a la proteasa) tendría éxito en la fecundación del ovocito. A esto se le sumaría las modificaciones que experimenta la ZP revistiéndose de los sitios de unión de espermatozoide-ZP (Rodeheffer y Shur, 2004, Lyng y Shur, 2006), lo que representa un mecanismo diferente para seleccionar el espermatozoide fecundante (Schatten, 2008, Florman y Fissore, 2015). La selección del espermatozoide, ya sea por resistencia a pronasa pre-fecundación o por unión selectiva a la ZP, puede representar las diversas formas mediante la cual se regula la polispermia (Wang y col., 2003, Tsaadon y col., 2006, Coy y col., 2008a, Dale y DeFelice, 2011, Papi y col., 2012).

La FIV en el bovino se realiza rutinariamente a una concentración fija de 1 millón de espermatozoides/ml con una proporción de espermatozoides-ovocito de 5000:1 (Rizos y col., 2002a, Rizos y col., 2002c, Ward y col., 2002). Incrementar la relación de espermatozoides-ovocito por encima de 5000: 1 no aumentaría la tasa de clivaje ni de formación de blastocistos (Heeres y col., 1996, Tanghe y col., 2000). El cambio de tamaño de gota de fertilización de 50 μ l a 500 μ l tampoco tuvo efecto (Tanghe y col., 2000).

Generalmente, los ovocitos bovinos maduros son co-incubados con espermatozoides durante más de 16 horas. En contraste con lo que ocurre *in vivo* donde el ovocito ovulado se encuentra con muy pocos espermatozoides en el lugar de la fecundación, el ovocito está rodeado de un gran número de espermatozoides en la gota FIV. En el oviducto, por lo general hay tiempo suficiente para el bloqueo contra la polispermia se active antes de que otro espermatozoide de la misma o siguiente oleada llega a la célula (Florman y Fissore, 2015, Suarez, 2015). En la placa de FIV en condiciones *in vitro*, existe la posibilidad de que el bloqueo para evitar la polispermia no tenga el tiempo suficiente para activarse. Se ha examinado el efecto del tiempo de exposición

de los espermatozoides y los ovocitos en el resultado de la fecundación *in vitro*. Se ha encontrado que un período de 24 h de co-incubación produce altas tasas de fertilización (76%) mientras que en períodos más cortos de co-incubación (4-12 h) las tasas fueron significativamente más bajas (25-54%) (Rehman y col., 1994). Los sistemas de fecundación *in vitro* más comunes en bovinos contemplan la co-incubación de espermatozoides y ovocitos por un período corto (<8 h) o largo (> 16 h). La exposición breve de los ovocitos a los espermatozoides podría mejorar el resultado de la FIV al incrementar la calidad del embrión (Berland y col., 2011), pero puede conducir a tasas de clivaje y desarrollo más bajas (Ward y col., 2002, Kochhar y col., 2003). Durante la co-incubación prolongada (> 16 h), los ovocitos y cigotos pueden estar expuestos a condiciones sub-óptimas de cultivo debido al aumento de ROS producido por los espermatozoides muertos y las enzimas hidrolíticas liberadas (Baker y Aitken, 2004, Dalvit y col., 2005b, Tsunoda y col., 2013). El tiempo de co-incubación de las gametas durante 18-24 horas con una concentración de espermatozoides entre 1 a $1,5 \times 10^6$ por ml puede lograr tasas aceptables de clivaje y desarrollo embrionario (Long y col., 1994, Rehman y col., 1994, Rizos y col., 2002c, Ward y col., 2002), pero una reducción de la co-incubación a 10 horas utilizando la misma concentración espermática también puede rendir tasas similares de clivaje y blastocistos (Ward y col., 2002). Otras metodologías incluyen el acortamiento sustancial del tiempo de co-incubación de (<6 h) sumado a un aumento significativo de la concentración espermática (hasta 6×10^6 /ml) (Brackett y Olyphant, 1975a, Nedambale y col., 2006a). Tanto la alta concentración espermática como el intervalo prolongado de co-incubación pueden resultar en un exceso de espermatozoides muertos que podría inducir el endurecimiento de la zona pelúcida y comprometer la FIV y la viabilidad de los embriones (Gianaroli y col., 1996a, Gianaroli y col., 1996b, Kattera y Chen, 2003). Se han propuesto protocolos alternativos para evitar la exposición prolongada del ovocito a una alta concentración de espermatozoides. Entre las estrategias propuestas figura la co-incubación de ovocitos y espermatozoides durante pocas horas seguido de un lavado de los ovocitos para remover cualquier exceso de espermatozoides adheridos y continuar la FIV por otras 12-15 h (Berland y col., 2011). Esta metodología es también utilizada en el cerdo con la finalidad de reducir la polispermia (Coy y Romar, 2002, Funahashi, 2003) y mejorar la eficiencia de la FIV (Grupe y Nottle, 2000, Gil y col., 2004, Nagai y col., 2006, Gil y col., 2007).

La co-incubación prolongada de ovocitos y espermatozoides durante la FIV podría tener efectos adversos sobre el desarrollo embrionario posterior debido a la producción excesiva de ROS y a la tasa de polispermia que probablemente aumente con una co-incubación prolongada (Sumantri

y col., 1996). Los espermatozoides que rodean a los COCs durante la FIV lo hacen dentro de las 2 primeras horas de iniciado la co-incubación (Sumantri y col., 1996). En ganado cebú, los resultados de la FIV no mejoran cuando los espermatozoides y ovocitos son co-incubados durante más de 12 h, independientemente del método de selección de espermatozoides utilizado (swing-up, gradientes de Percoll, lavado por centrifugación) (Dode y col., 2002).

El semen congelado ha mostrado ser más susceptible a la peroxidación lipídica y al daño por radicales libres que el semen fresco (Bell y col., 1993, Vishwanath y Shannon, 1997, Bilodeau y col., 2001, Foote y col., 2002). La significancia e impacto de los radicales libres sobre la función espermática está bien documentada (de Lamirande y Gagnon, 1995, Griveau y Le Lannou, 1997, Lapointe y Bilodeau, 2003, Fujii y col., 2005, Killian, 2011). Entre los efectos más notorios podemos remarcar pérdida de motilidad espermática, capacidad disminuida de fusionarse con el ovocito y menor capacidad fecundante debido a la peroxidación de los lípidos de la membrana plasmática del espermatozoide (Aitken y col., 1989, Aitken y Fisher, 1994, Aitken, 1995, Opuwari y Henkel, 2016). En consecuencia, el uso de antioxidantes podría resultar benéfico para preservar la integridad y capacidad fecundante de los espermatozoides (Irvine, 1996, Boquest y col., 1999, Dalvit y col., 2005a) e incrementar la tasa de ovocitos fecundados y divaje (Parrish y First, 1991, du Plessis y col., 2008, Xu y col., 2009, Parrish, 2014). Generalmente, los medios FIV no presentan en su formulación un agente antioxidante. Como consecuencia de ello, el semen se encuentra desprotegido contra los radicales libres y los procesos oxidativos (Aitken y col., 1989, Sanocka y Kurpisz, 2004, du Plessis y col., 2008, Aitken y col., 2012). Los diferentes medios de fecundación utilizados para fertilizar los ovocitos *in vitro* se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Medios FIV. Principales diferencias

Reactivo\Medio	BO	M199-FIV	TALP-FIV	SOF-FIV
Publicación	(Brackett y Oliphant, 1975a)	(Nedambale y col., 2006a)	(Parrish y col., 1999)	(Ferré y col., 2016)
Ácido ascórbico (mM)		0,0003		
Cafeína (mM)	10	10		
Fructosa (mM)				0,5
Glucosa (mM)	13,9	13,9		
Glutation (mM)		0,0002		
Hepes (mM)		25		

NaCl (mM)	112	103	114	107,7
NaHCO ₃ (mM)	37	37	26	25
KCl (mM)	4,02	5,37	3,2	7,16
Mioinositol (mM)		0,0003		
KH ₂ PO ₄ (mM)				1,19
Sodium Lactate (mM)			10	5,3
NaH ₂ PO ₄ (mM)	0,83	0,88	0,4	
CaCl ₂ ·2H ₂ O (mM)	2,25	1,36	1,8	1,7
MgSO ₄ ·7H ₂ O (mM)	0,52	0,88		
MgCl ₂ ·6H ₂ O (mM)			0,5	0,49

Bajo condiciones “*in vivo*”, los espermatozoides potencialmente fértiles son separados de los espermatozoides inmóviles, anormales, debris y plasma seminal en el tracto genital de la hembra durante la migración a través de del cervix y útero (Hafez y Hafez, 2000b). Durante este proceso, los espermatozoides con motilidad progresiva, funcionales y con acrosoma intacto experimentan cambios fisiológicos donde adquieren la competencia para fecundar el ovocito (“capacitación”) (Hafez y Hafez, 2000b, Gordon, 2003b, Suarez, 2015).

La fertilización *in vitro* ha sido utilizada con éxito para el tratamiento de algunos problemas de infertilidad humana desde 1978. Recién en el año 1982 se obtuvo el primer ternero nacido de ovocitos fertilizados y cultivados en condiciones de laboratorio (Brackett y col., 1982) y a inicios de los '90, el primer ternero completamente producido *in vitro* (Fukuda y col., 1990). Esto generó una necesidad de mejorar las técnicas de separación de espermatozoides con el fin de incrementar la población de espermatozoides con alta motilidad progresiva, morfología normal, limpios de impurezas, medio de congelación y plasma seminal (Parrish y col., 1986, Leibfried-Rutledge y col., 1989, Zavos, 1992, Parrish y col., 1995, Rodriguez-Martinez y col., 1997).

La calidad post-descongelado del semen bovino es muy variable y acondicionar los espermatozoides para lograr una fertilización exitosa resulta extremadamente importante (Veznik y col., 2007). Son variados los métodos para enriquecer una muestra con espermatozoides motiles, libres de plasma seminal y medio de congelación. Entre ellos podemos mencionar el uso de centrifugación por gradiente de densidad, swim-up y combinación de swim-up/swim-down (Berger y col., 1985, Van der Zwalmen y col., 1989, Mortimer y Mortimer, 1992, Mortimer, 1994,

Avery y Greve, 1995, Leonetti y col., 1995, Mortimer, 2000a, Henkel y Schill, 2003, Morrell, 2006, Paasch y col., 2007, Henkel, 2012). Estos métodos, en su mayoría, provienen de intentar la separación de espermatozoides X e Y, para la obtención de semen "sexado" (Gledhill, 1988, Han y col., 1993, Mortimer, 1994, Gawecka-Szczygiel y Kurpisz, 1995, Flaherty y Matthews, 1996, De Jonge y col., 1997, Mortimer, 2000a, Yan y col., 2006, Wolf y col., 2008).

Además de la separación de espermatozoides con alta motilidad progresiva, remover el plasma seminal, agentes crioprotectores, material diluyente y debris, también puede iniciar la capacitación (Centola y col., 1998).

Existen 4 métodos básicos para separar espermatozoides motiles del plasma seminal y medio de congelamiento (Mortimer, 1994, Mortimer, 2000a, Henkel y Schill, 2003, Henkel, 2012):

1-dilución y lavado, 2-migración, 3-lavado selectivo por gradiente de densidad y 4-métodos adherentes. El primero resulta de la dilución del semen 5 a 10 veces y la separación de los espermatozoides por centrifugación. Esto se repite 2 a 3 veces. La fracción con la cual se va a inseminar incluye a los espermatozoides motiles, muertos, moribundos y anormales al no ser selectiva. El segundo método es una combinación de migración y sedimentación gravitacional selectiva por centrifugación en un medio de cultivo. Entre las técnicas contamos con swim-up y swim-up/swim-down (ver **Figura 9**). El tercer método consiste en la separación selectiva de espermatozoides por centrifugación en gradiente de densidad (**Figura 10**). La técnica separa espermatozoides motiles a través de capas discontinuas (diferente densidad: 90%-45% o 80%-40%). El semen descongelado, colocado en la parte superior de las capas, es forzado a pasar por ellas por centrifugación. El cuarto método se basa en transponer los espermatozoides descongelados a través de una columna de filtración.

El sistema de separación ideal debería ser 1) rápido, fácil de operar y costo-efectivo, 2) separar la mayor cantidad posible de espermatozoides motiles, 3) no causar daño a los espermatozoides o alteraciones fisiológicas, 4) eliminar los espermatozoides muertos, anormales y otras células como leucocitos y bacterias, y 5) eliminar sustancias toxicas (endotoxinas), factores descapacitantes y compuestos oxidativos (ROS).

Una de las metodologías más utilizadas para separar células espermáticas motiles en el bovino es la centrifugación por gradiente de densidad a través de una sustancia coloidal. Este gradiente puede ser continuo (Bolton y Braude, 1984) o discontinuo (Pousette y col., 1986). En el continuo

existe un gradual incremento de la densidad desde la parte superior hacia el fondo del tubo. En cambio, en el discontinuo, existe una marcada diferencia y separación entre la capa superior e inferior.

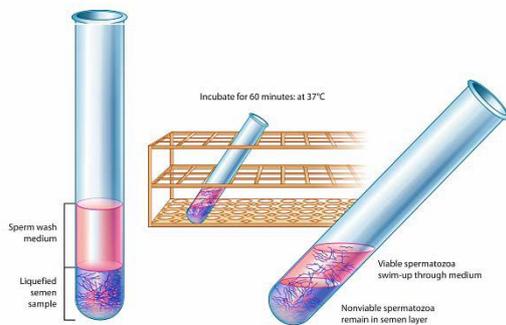


Figura 9: La técnica de swim-up. El semen descongelado es cuidadosamente depositado en la parte inferior del tubo que contiene el medio de lavado. El tubo se coloca en un ángulo de 45° y se incuba durante 60 minutos a temperatura controlada. Los espermatozoides viables nadan hacia el medio de lavado del cual se los aspira (Beydola y col., 2013)

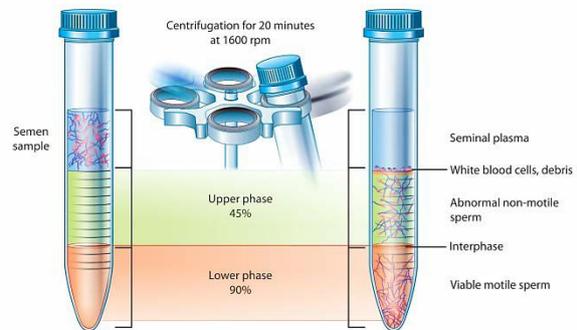


Figura 10: Centrifugación por gradiente de densidad. Los gradientes inferior (80-90%) y superior (40-45%) son cuidadosamente constituidos en capas. El tubo es centrifugado a una velocidad alta (aproximadamente 2000-2500 rpm) durante 10-15 minutos. El sobrenadante es descartado y el pellet obtenido es nuevamente centrifugado a una velocidad baja (1200 rpm). Los espermatozoides muertos, anormales, medio de congelación es retenido en las capas superiores. Los espermatozoides motiles se ubican en la parte inferior del gradiente (Beydola y col., 2013).

Durante la centrifugación los espermatozoides son forzados a pasar a través de la capa coloide y concentrarse en la zona de densidad más a fin a la suya (punto isopícnico) (Mortimer, 1994, Mortimer, 2000a, Henkel y Schill, 2003, Henkel, 2012, Beydola y col., 2013). Alterando la fuerza y tiempo de centrifugación y la densidad del coloide, es posible recuperar espermatozoides intactos, funcionales y competentes. Hasta ahora la centrifugación más utilizada por los laboratorios de fertilidad asistida es la de capas discontinuas (90%/45% ó 80%/40%) pero recientemente han aparecido algunas publicaciones utilizando la centrifugación por capa simple (Thys y col., 2009).

La selección de espermatozoides por centrifugación en gradiente de densidad discontinuo ha probado ser efectiva para mejorar la motilidad de la muestra recuperada (Parrish y col., 1995), el

porcentaje de células espermáticas con morfología normal (Prakash y col., 1998), y con membrana y acrosoma intactos (Oliveira y col., 2012). El gradiente de Percoll proporciona una mayor recuperación de espermatozoides motiles en comparación con el swim-up (Parrish y col., 1995) y con resultados de FIV más exitosos. Sin embargo, se han notado variaciones entre partidas de Percoll y algunos lotes pueden ser perjudiciales para los espermatozoides afectando tasas de formación de blastocistos y eclosión (Avery y Greve, 1995). Por otra parte, la tasa de recuperación del swim-up y con calidad de espermatozoides variable en comparación con el gradiente de densidad (Parrish y col., 1995, Correa y Zavos, 1996). Tanto el swim-up como el gradiente de densidad utilizan el lavado y centrifugación pero existen diferencias en los procedimientos en que cómo cada uno de estos métodos selecciona los espermatozoides motiles de los no-motiles. La centrifugación, utilizada en ambos métodos, puede dañar el espermatozoide debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la peroxidación de las membranas de los espermatozoides, que puede traer efectos negativos en la interacción espermatozoide-ovocito (Kim y Parthasarathy, 1998, Watson, 2000). Además, se ha sugerido que el paso de los espermatozoides a través del gradiente de Percoll podría inducir capacitación (Rosenkranz y Holzmann, 1997, Centola y col., 1998). Por lo tanto, debido a esta potencial pre-capacitación de los espermatozoides debido a la centrifugación y/o gradiente, el tiempo de co-incubación (espermatozoide-ovocito) podría reducirse evitando el daño citotóxico causado por el aumento de ROS (Kim y col., 1999). De hecho, una reducción en la exposición de los ovocitos a los espermatozoides podría favorecer la viabilidad del embrión debido a una disminución a la exposición de los desechos metabólicos de origen espermático (Fiorentino y col., 1994, Gianaroli y col., 1996a, Gianaroli y col., 1996b, Quinn y col., 1998, Dirfeld y col., 1999, Kattera y Chen, 2003). Además, cuanto antes los espermatozoides están capacitados más temprano podría ocurrir la penetración/fecundación del ovocito evitando el proceso de envejecimiento, que también puede causar una fertilización anormal y/o un defecto durante el crecimiento embrionario temprano (Chian y col., 1992, Miao y col., 2009, Koyama y col., 2014a, Ge y col., 2015).

1.3.1. El espermatozoide

La producción de espermatozoides (espermatogénesis) es un proceso largo que ocurre en los testículos. En la base de los túbulos seminíferos, las células madres espermatogónicas se dividen por mitosis para producir cíclicamente espermatoцитos primarios. Éstos se someten a la meiosis de producir las espermátidas haploides, que se diferencian en espermatozoides y son

liberados en el lumen tubular. La espermatogénesis se encuentra bajo una compleja regulación hormonal (FSH, LH, testosterona y 17β estradiol) e involucra cuatro eventos celulares importantes: 1) Espermatogoniogénesis: proceso continuo que involucra la división de las espermatogonias A que mantienen el pool de células madre y la producción de espermatogonias B para la producción de espermatozoides; 2) Meiosis: se produce la diferenciación del espermatocito primario a partir de la espermatogonia B (última división mitótica) y la diferenciación de éste en espermatocito secundario con la posterior formación de espermátidas; 3) Espermiogénesis: proceso por el cual las espermátides sufren morfogénesis para convertirse en un espermatozoide maduro y motil y 4) Espermiación: consiste en la liberación de la espermátida elongada o espermatozoide que es el producto final de la espermatogénesis, hacia la luz tubular (Guraya, 1987e, Guraya, 1987d, de Rooij y Russell, 2000, Garner y Hafez, 2000, White-Cooper y col., 2009, O'Shaughnessy, 2015, Toshimori y Eddy, 2015, Valli y col., 2015). Los espermatozoides permanecen inmóviles en el testículo y también en su lugar de almacenamiento (el epidídimo). En el epidídimo adquieren la capacidad de moverse hacia adelante (motilidad progresiva) y solo se convierten en motiles después de la eyaculación (Mortimer, 1997, Robaire y Hinton, 2015). Así es que los espermatozoides permanecen inactivos durante el almacenamiento pero listos para activarse cuando sea apropiado (Fawcett, 1975, Guraya, 1987c). Además de las células germinales en desarrollo, en el epitelio seminífero se encuentran las células de Sertoli encargadas de proveer soporte estructural y nutrición a las células germinales (Hess y Franca, 2008, Vogl y col., 2008, Oliveira y Alves, 2015b, Oliveira y Alves, 2015a). Las células de Sertoli sostienen el epitelio germinativo y constituyen la estructura del túbulo seminífero (Vogl y col., 2008). Descansan sobre la membrana basal del túbulo y se unen unas con otras por complejos de unión formando una pared evitando que los diferentes estratos celulares germinativos penetren a la luz del túbulo seminífero (Gilula y col., 1976, Russell y Peterson, 1985, Guraya, 1987b, Griswold, 1995, Cheng y Mruk, 2002, Lui y col., 2003, Vogl y col., 2008, Oliveira y Alves, 2015b). El espermatozoide de mamífero es el producto final del proceso de la gametogénesis en el macho (**Figura 11**). Es una célula con movimiento activo constituida por una cabeza y flagelo móvil o cola formada por cuello, pieza media, pieza principal y filamento terminal (Fawcett, 1975, Garner y Hafez, 2000, Howard y col., 2009, Toshimori y Eddy, 2015). La cabeza del espermatozoide de mamífero contiene el núcleo con la cromatina fuertemente condensada y el acrosoma rodeado por una moderada cantidad de componentes del citoesqueleto y citoplasma (Guraya, 1987a). El acrosoma es una gran vesícula secretora que se encuentra localizada en el extremo anterior de la cabeza espermática. Se origina a partir del complejo de Golgi durante el estadio de espermátide y contiene enzimas necesarias para la

penetración de la cubierta del ovocito (Florman y First, 1988, Zaneveld y Jonge, 1991, Wassarman, 1999, Bedford, 2011, Yanagimachi, 2011). De estas enzimas la hialuronidasa y la acrosina juegan un rol central, al dispersar el cumulus oophorus y provocar la lisis local de la zona pelúcida respectivamente (Breitbart y Naor, 1999). Este lisosoma especializado se encuentra constituido por una membrana acrosomal interna que rodea la porción anterior de la membrana nuclear y que se continúa ininterrumpidamente formando la membrana acrosomal externa, la cual se extiende cerca de la superficie interna de la membrana plasmática de la porción anterior de la cabeza. El acrosoma posee dos segmentos, el casquete acrosómico o acrosoma anterior y el segmento ecuatorial por el cual el espermatozoide hace contacto con el ovocito en el momento de la fecundación (Saacke y Almquist, 1964, Zaneveld y Jonge, 1991, Abou-Haila y Tulsiani, 2000). Durante la reacción acrosómica la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide se fusionan formando vacuolas en la superficie que permiten la salida del contenido acrosomal (Wassarman, 1999, Wassarman y col., 2001, Bedford, 2011, Evans, 2012).

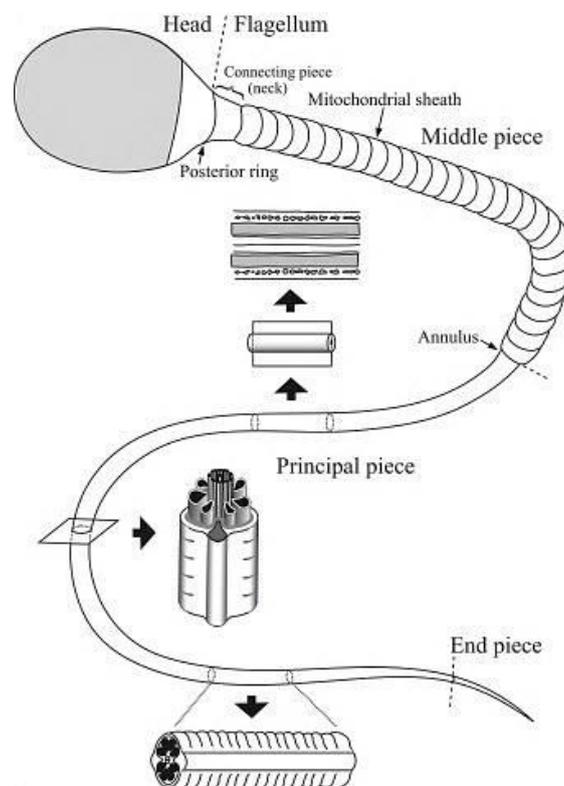


Figura 11: Características generales del espermatozoide mamífero (Eddy, 2006, Toshimori y Eddy, 2015)

La cola de los espermatozoides mamíferos se encuentra constituida por varios componentes funcionalmente dependientes. Aunque el tamaño y la forma de estos pueden variar de una

especie a la otra, su organización estructural es muy similar. La cola puede dividirse en cuatro segmentos: el cuello, la pieza media, la pieza principal y la pieza final, todas ellas rodeadas por una membrana plasmática común (Guraya, 1987f, Garner y Hafez, 2000). El axonema es una estructura común a todas las regiones de la cola, se localiza centralmente, y es el aparato motor del espermatozoide. Está compuesto por un par de microtúbulos centrales rodeados de nueve pares o dobletes espaciados de modo uniforme (9 + 2). Los nueve dobletes están rodeados por nueve fibras densas externas. En cada doblete, el microtúbulo más interno proyecta dos brazos de dineína hacia el doblete adyacente, en el sentido de las agujas del reloj, uno más externo y otro más interno. Los nueve pares están conectados entre sí por puentes proteicos de nexina. Rodeando a los dos túbulos centrales hay una vaina o filamento helicoidal formado a partir de las proyecciones radiales (Garner y Hafez, 2000). Las estructuras que rodean al haz de fibras axiales permiten diferenciar las piezas intermedia y principal de la cola del espermatozoide. En la pieza intermedia el axonema se encuentra rodeado por una vaina de mitocondrias que se retuercen regularmente alrededor de él unas 32 veces. Estas mitocondrias son las encargadas de generar el ATP necesario para agitar el flagelo e impulsar el espermatozoide. La pieza principal está rodeada por una cubierta fibrosa estriada. El filamento terminal de la cola es la porción más distal de la cola y comienza en el punto donde desaparece la cubierta fibrosa (Garner y Hafez, 2000). Todas estas estructuras especializadas que posee el espermatozoide están en relación con su actividad funcional única. El acrosoma contiene enzimas esenciales para la fecundación y el flagelo contiene las fuentes de energía y la maquinaria necesaria para el movimiento. El rol de estas estructuras es asegurar la liberación del material nuclear, contenido en la cabeza del espermatozoide, dentro del citoplasma del ovocito en donde la combinación del pronúcleo femenino y masculino formará el cigoto (Wassarman, 1987, Yanagimachi, 1994a, Garner y Hafez, 2000, Hafez y Hafez, 2000a, Wassarman y col., 2001, Primakoff y Myles, 2002, Cummins, 2009, Howard y col., 2009, Yanagimachi, 2011, Evans, 2012, Toshimori y Eddy, 2015).

Los espermatozoides liberados al lumen desde los túbulos seminíferos no han completado su diferenciación por lo que no son capaces de fertilizar el ovocito. La capacidad fecundante se consigue durante el pasaje de la gameta a través de las distintas regiones del epidídimo. Junto a la adquisición de esta capacidad el espermatozoide sufre una serie de cambios madurativos. El primero de ellos en ser reconocido fue la adquisición de la capacidad de moverse hacia adelante (motilidad progresiva). La maduración del potencial de motilidad espermática implica no solo un aumento cuantitativo en el porcentaje de espermatozoides motiles sino también, una diferencia

cualitativa en el patrón de movilidad (Guraya, 1987c, Lindemann y Kanous, 1989, Ren y col., 2001, Turner, 2006, Gaffney y col., 2011). Además de la adquisición de esta capacidad, los espermatozoides del epidídimo desarrollan la habilidad de sufrir eventualmente la reacción acrosómica, reconocer y unirse a la zona pelúcida, y la capacidad de fusionarse a la membrana vitelina del ovocito (Zaneveld y Jonge, 1991, Yanagimachi, 1994a, Wassarman, 1999, Wassarman y col., 2001, Yanagimachi, 2011). Concomitantemente a estos cambios funcionales, durante el tránsito epididimal, los espermatozoides sufren múltiples cambios estructurales, los cuales incluyen la migración de la gota citoplasmática (remanente citoplasmático de la espermátida) a lo largo del flagelo del espermatozoide, remodelación acrosomal, cambios en la cromatina y en algunas de las organelas del flagelo, y cambios en los lípidos de membrana y proteínas de superficie (Berdston y Desjardins, 1974, Wassarman, 1999, Hess y Franca, 2008, Cummins, 2009, Howard y col., 2009, Yanagimachi, 2011, Oliveira y Alves, 2015c, Robaire y Hinton, 2015, Toshimori y Eddy, 2015).

1.3.2. Capacitación del espermatozoide

El fenómeno de la capacitación fue identificado y descrito inicialmente en espermatozoides de conejo, donde para alcanzar la habilidad o competencia para penetrar el ovocito maduro era necesario haber pasado algún tiempo por el tracto genital femenino (Austin, 1951, Chang, 1951, Austin, 1952, Chang y Marden, 1954, Chang, 1959). En bovinos, se realizaron pruebas capacitando los espermatozoides en el oviducto y útero bovino y del conejo antes de realizar la FIV (Iritani y Niwa, 1977). Los espermatozoides son células altamente especializadas que son incapaces de fecundar los ovocitos hasta experimentar una serie de cambios bioquímicos que en conjunto se denominan “capacitación” (Austin, 1952, Chang, 1984, Fraser, 1998, Visconti y col., 1998, Florman y Fissore, 2015). La capacitación es el término utilizado para cubrir diversos eventos, que incluyen la expresión de un patrón de hiperactivación de la motilidad y la adquisición de la capacidad de responder a las señales únicas que emanan del ovocito (Yanagimachi, 1994a, Turner, 2006, Fraser, 2010, Florman y Fissore, 2015). La glucoproteína de la zona pelúcida (ZP3) actúa como un sitio de reconocimiento y como activador o desencadenante fisiológico, estimulando al espermatozoide para someterse a un evento de exocitosis conocido como la reacción acrosómica. Los segundos mensajeros generados como resultado de la interacción espermatozoide-ZP3 incluyen el ingreso de calcio extracelular y la alcalinización del citoplasmática (Fraser, 1998, Darszon y col., 2006, Costello y col., 2009, Visconti y col., 2011, Santi y col., 2013). La capacitación está ahora claramente reconocida como

un proceso que implica una serie compleja de reacciones bioquímicas y fisiológicas en el espermatozoide (Breitbart y Spungin, 1997, Breitbart y Naor, 1999, Breitbart, 2002, Breitbart y col., 2005). También se conoce ahora que el proceso de capacitación puede ser revertido por la re-exposición del espermatozoide capacitado al plasma seminal (Harrison, 1996). Las glándulas vesiculares secretan una gran variedad de proteínas que se unen a la superficie del espermatozoide en el momento de la eyaculación. La capacitación involucra la liberación de éstos factores anti-capacitantes del espermatozoide durante su tránsito por el oviducto por intermedio del epitelio oviductal, y en avance hacia el sitio de fecundación en ámpula del oviducto (Lefebvre y Suarez, 1996, Lefebvre y col., 1997, Rodriguez-Martinez, 2007a). Los cambios en los lípidos que se producen en la membrana plasmática del espermatozoide durante la capacitación incrementan las facultades y propiedades intrínsecas de membrana, como son la permeabilidad, la adhesividad y la fusibilidad (Harrison, 1996, Therien y col., 1999, Therien y col., 2001, Manjunath y Therien, 2002, Gadella, 2008, Leahy y Gadella, 2011). El papel de los iones de calcio en la capacitación espermática y reacción acrosomal es esencial (Spungin y Breitbart, 1996, Darszon y col., 1999, Darszon y col., 2001, Ho y col., 2002, Malcuit y col., 2006, Whitaker, 2006, Marquez y Suarez, 2007, Costello y col., 2009, Bailey, 2010, Fraser, 2010, Visconti y col., 2011, Santi y col., 2013, Wertheimer y col., 2013, Kashir y col., 2014). El Ca^{2+} es activamente transportado al acrosoma por una bomba se libera a través del canal de calcio IP3 (Dragileva y col., 1999). La bomba de calcio intracelular esta activa durante la capacitación y tiene un rol importante en la regulación de los iones de calcio intracelulares durante la capacitación y la reacción acrosómica (Fraser, 1995, Spungin y Breitbart, 1996, Breitbart, 2002, Landim-Alvarenga y col., 2004, Darszon y col., 2005). El estrés oxidativo puede afectar la calidad del semen ya que los ROS pueden inducir daño en el ADN del espermatozoide. Los espermatozoides son transcripcionalmente poco activos y tienen poco citoplasma y por ende son deficientes en antioxidantes y en sistemas de reparación del ADN (Aitken y Krausz, 2001, Aitken y Marshall Graves, 2002, Aitken y Baker, 2006). En el momento de la eyaculación, el espermatozoide está expuesto a las proteínas del líquido seminal. Durante esta breve exposición, las proteínas del líquido seminal eliminan una cantidad significativa de colesterol el cual es acompañado por la liberación de algunos fosfolípidos. Esta salida de lípidos desestabiliza ligeramente la membrana de los espermatozoides. Al mismo tiempo, las proteínas del líquido seminal cubren la superficie del espermatozoide a través de su interacción con los fosfolípidos de membrana. Este revestimiento de las proteínas del líquido seminal impide la libre circulación de los fosfolípidos y de esta manera estabiliza la membrana espermática. En el oviducto se eliminan éstas proteínas del líquido seminal de la membrana de los espermatozoides dejando a los lípidos de membrana

moverse libremente. Por acción de lipoproteínas presentes en el oviducto, se induce un segundo flujo de salida de colesterol provocando una mayor desestabilización de la membrana y también desencadenar ciertas señales de transducción. Estas señales podrían regular la expresión de los receptores de superficie de la ZP y la adhesión podría desencadenar la reacción del acrosoma (Therien y col., 1999, Therien y col., 2001, Therien y col., 2005). En resumen, la capacitación consiste en alteraciones de la membrana plasmática, tales como la eliminación de los factores de decapitación, la eliminación del colesterol, la entrada de Ca^{2+} a la célula, el aumento del pH intracelular, el aumento de la fosforilación proteica y la hiperpolarización de la membrana. (Florman y Ducibella, 2006, Malcuit y col., 2006, Whitaker, 2006, Schatten, 2008, Kashir y col., 2014, Florman y Fissore, 2015).

1.3.3. Hiperactivación

A diferencia de espermatozoides de varias especies animales, los espermatozoides de los mamíferos son incapaces de fertilizar los ovocitos inmediatamente después de la eyaculación. Requieren de un proceso de capacitación que en condiciones "*in vivo*" se realiza en el tracto reproductivo de la hembra (Yanagimachi, 1994b). El fenómeno de hiperactivación fue sugerido al notar un vigoroso movimiento del flagelo del espermatozoide y que esa aceleración jugaba un papel importante en la penetración de la zona pelúcida del ovocito (Yanagimachi y Chang, 1963, Yanagimachi, 1969a, Yanagimachi, 1969b, Yanagimachi, 1970, Stauss y col., 1995). También es posible que el espermatozoide hiperactivado pueda ser más eficaz para traspasar el moco del oviducto y la matriz del cumulus en la situación *in vivo* (Killian, 2011). Los patrones de motilidad cambiantes evidenciados por el espermatozoide durante la capacitación se detectaron después de la incubación con fluido ampular oviductal (Grippo y col., 1995). La motilidad del espermatozoide hiperactivado se caracteriza por una alta amplitud y movimientos flagelares asimétricos (**Figura 12**). El Ca^{2+} es esencial para la iniciación y el mantenimiento de la motilidad del espermatozoide hiperactivado. El Ca^{2+} proviene de varias fuentes: de las reservas intracelulares mediada por los receptores de inositol 1,4,5 trifosfato (IP3), del calcio proveniente de la mitocondria o de la teca perinuclear o del que ingresa gracias a sistemas de canales (Yanagimachi, 1994b, Kay y Robertson, 1998, Visconti y col., 1998, Mortimer y Maxwell, 1999, Ho y Suarez, 2001b, Ho y col., 2002, Darszon y col., 2005, Florman y Ducibella, 2006, Marquez y Suarez, 2007, Florman y Fissore, 2015). El movimiento vigoroso de espermatozoide también requiere ATP y monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) (Ho y Suarez, 2001b, Suarez y Ho, 2003, Suarez, 2008). La evidencia apoya que el Ca^{2+} es el factor de regulación de la

hiperactivación más importante y que se requiere el AMPc, pero éste último no sería suficiente para desencadenar la hiperactivación (Ho y col., 2002). Los iones de calcio entran en la célula espermática por medio de canales (Darszon y col., 1999, Darszon y col., 2001, Ren y col., 2001, Marquez y Suarez, 2004, Darszon y col., 2005, Darszon y col., 2006, Marquez y Suarez, 2007, Costello y col., 2009, Visconti y col., 2011).

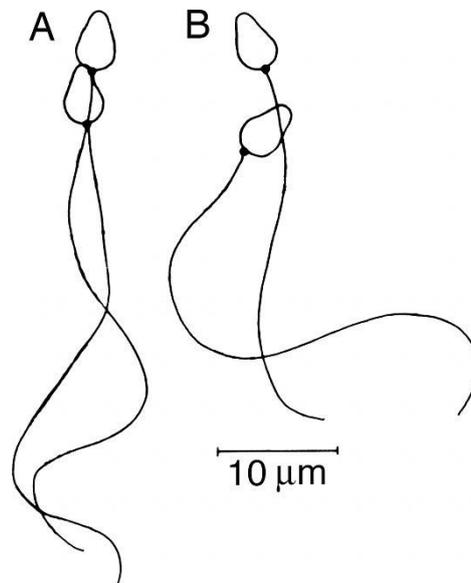


Figura 12: Patrón de movimiento del flagelo espermático regular, curvas simétricas y trayectoria lineal (A) e hiperactivado (B) (Suarez, 2008)

La evidencia muestra diferentes tipos de canales (Ren y col., 2001, Darszon y col., 2006, Darszon y col., 2007, Darszon y col., 2011, Lishko y col., 2012, Miller y col., 2015): i) canales de Ca^{2+} dependientes o activados por voltaje (Quill y col., 2001), ii) canales de Ca^{2+} activados por nucleótidos cíclicos (Wesner y col., 1998) y iii) canales iónicos transitorios (Darszon y col., 2011).

La capacitación es el proceso que permite que ocurra la reacción acrosomal y la adquisición de la capacidad fecundante por parte del espermatozoide. Esto se logra mediante la remoción de los factores decapacitantes, incluidos en el plasma seminal y la interacción con factores capacitantes (Yanagimachi, 1994b, Florman y Ducibella, 2006, Florman y Fissore, 2015). Estos factores producen cambios bioquímicos y estructurales que conducen a la eliminación de los componentes decapacitantes adheridos a la membrana plasmática del espermatozoide, cambio en la composición lipídica de la membrana, aumento de la permeabilidad al calcio, cambio de pH interno y aumento del metabolismo celular que ayuda a sostener el cambio del patrón de motilidad y velocidad espermática (hiperactivación). La capacitación es iniciada por factores de

transducción llamados primeros mensajeros, los cuales se unen a receptores específicos de la membrana plasmática de los espermatozoides. Estos factores parecen estar afectados (activación y modulación) por el nivel de AMPc (Visconti y Kopf, 1998). Estos factores capacitantes también generan o inducen cambios en la membrana plasmática del espermatozoide a través de la estimulación del flujo de colesterol y fosfolípidos (Therien y col., 2005). El cambio temporal de la relación colesterol:fosfolípidos conduce a un incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática. Este cambio de permeabilidad facilita la internalización de estos mensajeros (primarios, secundarios, etc.) en el espermatozoide (Aitken y Nixon, 2013).

Entre las funciones fisiológicas de la hiperactivación figuran: i) asegurar el movimiento progresivo a través de los fluidos viscosos que el espermatozoide se encuentra durante el tránsito en el tracto reproductor femenino, ii) facilitarle al espermatozoide la penetración de la matriz extracelular (conocida como la zona pelúcida) de la célula del cumulus y del ovocito, iii) permitir la liberación de los espermatozoides de los reservorios (pudiendo existir múltiples) en el camino al sitio de fecundación (la ampulla) (Darszon y col., 2011).

Existen características distintivas entre la motilidad progresiva y la motilidad hiperactiva. La primera se caracteriza por un movimiento flagelar vigoroso, de baja amplitud y larga longitud de onda y relativamente simétrico que da como resultado un rápido movimiento de avance lineal. La motilidad hiperactiva se desencadena luego de un determinado período de tiempo en el tracto reproductivo femenino, y se caracteriza por movimientos flagelares como golpes de látigo, de alta amplitud y baja longitud de onda, asimétricos, y con una trayectoria de avance circular o irregular (Bedford, 1970, Yanagimachi, 1994b, Ho y Suarez, 2001b, Florman y Ducibella, 2006, Bailey, 2010, Florman y Fissore, 2015). El fenómeno de hiperactivación se produce durante el proceso de capacitación, pero no se ha determinado aún con exactitud si la hiperactivación es una consecuencia de la capacitación o si ambos son procesos independientes que se producen de forma simultánea (Tulsiani y Abou-Haila, 2012). Este fenómeno de hiperactivación serviría en primer lugar para facilitar el avance del espermatozoide a través del fluido viscoso del oviducto, así como también, a través de la matriz extracelular del cumulus y de la zona pelúcida. En segundo lugar, la hiperactivación ayudaría al espermatozoide a ascender por el oviducto hasta el sitio de fecundación al permitir que éste se libere de la adhesión transitoria ejercida entre la gameta y el epitelio oviductal (Florman y Ducibella, 2006, Florman y Fissore, 2015). Los espermatozoides de varias especies de mamífero son orientados hacia el ovocito mediante el

fenómeno de quimiotaxis (Kaupp y col., 2008). Los espermatozoides son direccionados hacia un gradiente de concentración de sustancias quimioatrayentes aportadas por el líquido folicular, el ovocito maduro y las células del cumulus (Eisenbach, 1999b, Eisenbach, 1999a, Sun y col., 2005, Eisenbach y Giojalas, 2006, Chang y Suarez, 2010). Además se ha descubierto que los espermatozoides podrían orientar su motilidad siguiendo un gradiente térmico superficial existente a lo largo del oviducto ya que, existe en el oviducto una diferencia de 1 a 2 °C entre el sitio de fecundación y el de almacenamiento espermático (Bahat y Eisenbach, 2006). Los espermatozoides serían guiados al sitio de fecundación siguiendo un gradiente térmico y alcanzarían el COC por quimiotaxis cuando los espermatozoides se encuentran a pocos milímetros de este (Eisenbach y Giojalas, 2006, Florman y Ducibella, 2006, Chang y Suarez, 2010, Florman y Fissore, 2015).

Muchas sustancias son reconocidas como factores capacitantes. La más comúnmente utilizada es la heparina (Parrish y col., 1986, Parrish y col., 1988, Parrish, 2014). La heparina estimula el incremento del calcio intracelular, pH y AMPc, el cual parece tener un rol importante como disparador de las señales y cascada de eventos del proceso de capacitación (Breininger y col., 2010). Además de la heparina, la cafeína ha sido ampliamente utilizada como suplemento en medios de fertilización *in vitro* como inductora de la capacitación espermática (Park y col., 1989b).

La enzima AMPc fosfodiesterasa (PDE) metaboliza AMPc a 5'-AMP. La PDE está presente en espermatozoides maduros (Visconti y Kopf, 1998). La cafeína es un inhibidor de la PDE, lo cual desencadena un incremento en los niveles de AMPc. La cafeína actuaría sinérgicamente con la heparina induciendo la capacitación, reacción acrosomal y la fusión de gametas *in vitro* (Nwa y Ohgoda, 1988). El uso de derivados de xantinas, como la cafeína y teofilina, para la estimulación farmacológica de las funciones espermáticas tuvieron gran impacto en la fertilización asistida en humanos en muestras seminales donde la motilidad espermática era reducida o muy baja (Lanzafame y col., 1994, Henkel y Schill, 2003, Henkel, 2012). En el caso del bovino, se utiliza la heparina, cafeína, pentoxifilina, y teofilina en el proceso de FIV con el fin de disminuir la variación en el desarrollo embrionario entre diferentes toros (Saeki y col., 1995, Numabe y col., 2001). Si bien la cafeína puede potenciar e incrementar la capacidad de penetración de espermatozoides congelados, puede no ser eficaz con todos los toros; necesitando en tal caso de otro/s estimulante/s (Hamawaki y col., 1995, Hori y col., 1997). Con determinados toros, espermatozoides tratados con teofilina lograron una tasa de penetración significativamente

mayor que los tratados con cafeína (Hamawaki y col., 1995). La combinación de heparina con alguna xantina puede incrementar la tasa de fertilización y aumentar significativamente el porcentaje de monospermia, en comparación con la heparina sola, resultando en un tratamiento efectivo y eficaz sobre todo para toros que muestran tasas de fertilización y producción de embriones bajos (Niwa y Ohgoda, 1988, Numabe y col., 2001).

1.3.4. Sexado de semen

Los métodos para separar espermatozoides portadores del cromosoma X e Y podrían tener un gran impacto en la producción ganadera, y en particular, un aumento de la eficiencia reproductiva en programas de mejoramiento. La separación y concentración de espermatozoides portadores del cromosoma X podría tener consecuencias importantes respecto a incrementar la presión de selección en programas de mejoramiento, mayor disponibilidad y accesibilidad en vaquillonas de reemplazo (Weigel, 2004, De Vries y col., 2008) aumentar la eficacia de las pruebas de progenie en IA, y de esa forma contribuir a aumentar el progreso genético en los programas de MOET y PIVE (Weigel, 2004) y aumentar la producción y rentabilidad del ganado lechero (De Vries y col., 2008).

Diversos métodos se han intentado para lograr la separación de espermatozoides portadores del cromosoma X e Y con diverso grado de éxito. Es conocido que el cromosoma Y es de menor tamaño que el cromosoma X y esta variación origina diferencias en el tamaño y forma de los espermatozoides, peso, densidad, motilidad, cargas eléctricas y la presencia de antígenos de superficie (Amann, 1989, Chandler y col., 1999, van Munster y col., 1999). Diferentes criterios han sido utilizados para la separación de los espermatozoides portadores del cromosoma X o Y. Uno de estos criterios se basa en su densidad. El espermatozoide que porta el cromosoma X es entre 2,9 a 4,2% más grande que el que porta el cromosoma Y, y por ende las densidades de los espermatozoides son diferentes. Estas diferencias de tamaño y densidad afectarían la capacidad o velocidad de desplazamiento del espermatozoide. Las técnicas y procedimientos de lavado y acondicionamiento del semen para la etapa de fertilización fueron candidatas para lograr separar fracciones enriquecidas con espermatozoides X o Y. Ejemplos son el método swim-up (Madrid-Bury y col., 2003, Yan y col., 2006, Wolf y col., 2008) y la centrifugación por gradiente de densidad en partículas de sílice coloidales tipo Percoll® (Upreti y col., 1988, Kobayashi y col., 2004, Wolf y col., 2008). También se han realizado separaciones basadas en la carga eléctrica de los espermatozoides que portan el cromosoma X o Y. Se demostró que los espermatozoides

que portan el cromosoma X migran más rápido en dirección al cátodo, por lo cual se han utilizado campos eléctricos para su separación (Simon y col., 2013, Nasr-Esfahani y Marziyeh, 2015). Otra estrategia utilizada para separar espermatozoides fue a través de procedimientos inmunológicos. El procedimiento se base en utilizar anticuerpos en contra del antígeno H-Y que está presente en los espermatozoides portadores del cromosoma Y (Howes y col., 1997, Blecher y col., 1999, Sang y col., 2011, Yang y col., 2014). Actualmente, la separación de espermatozoides X e Y se realiza en base a las diferencias en su contenido cromosómico de ADN mediante citometría de flujo (Garner y col., 1983, Pinkel y col., 1985, Johnson y Pinkel, 1986, Johnson y col., 1987b). Este método se lo considera como el más fiable y eficaz hasta el momento, logrando obtener más del 90% de pureza (Pinkel y col., 1985, Johnson y col., 1987b, Johnson y col., 1999, Garner y Seidel, 2003, Garner, 2006, Garner y col., 2013). La citometría de flujo permite la separación de los espermatozoides en base a la diferencia que tienen los espermatozoides que contienen el cromosoma X o Y en su contenido de ADN (Johnson y Welch, 1999). En el bovino la diferencia en el contenido de ADN entre un espermatozoide portador de un cromosoma sexual X y el Y es de aproximadamente 3,8% (Garner y col., 1983, Johnson y col., 1987a). El citómetro de flujo basa su eficiencia en separar espermatozoides portadores del cromosoma X o Y gracias a su habilidad de analizar la cantidad de luz emitida por cada espermatozoide cuando es impactada por luz ultravioleta proveniente de un haz de luz concentrado o “rayo láser”. La fluorescencia se logra mediante la tinción del ADN de los espermatozoides con un colorante vital Hoechst H33342. Este colorante fluorescente marca específicamente el ADN nuclear y al ser excitado por el haz de luz del citómetro refracta luz de manera proporcional al colorante absorbido. La luz emitida es detectado por el fotosensor del citómetro el cual procesa esta información para separar los espermatozoides en alguna de las 3 poblaciones o categorías: los X, los Y y los indeterminados y/o muertos (**Figura 13**). Una de las limitaciones de esta tecnología es el poco número de espermatozoides sexados. El máximo número de espermatozoides sexado por hora no es mayor que 5-6 millones de espermatozoides en cada fracción (X o Y), lo que implica una producción de pajuelas de semen sexado para inseminación artificial relativamente baja por máquina.



Figura 13: Separación de espermatozoides portadores de cromosomas X e Y por citometría de flujo (Johnson y Welch, 1999)

Si bien la técnica de sexado semen (SS) se encuentra disponible desde mediados de los '80, recién logra masividad y aceptación por parte de los productores lecheros a mediados del 2000 cuando los centros de inseminación artificial de EE.UU. y Europa adoptan la tecnología de sexado. El uso correcto del SS de acuerdo a las recomendaciones de los centros productores, permitió su rápida expansión e incorporación por parte del productor lechero Americano (Seidel, 1999, Johnson, 2000, Seidel, 2003a). En carne, la penetración fue más lenta y continúa aun siendo baja. El semen sexado es hoy utilizado en programas de IA, TE y PIVE logrando una eficiencia biológica entre 70-90% en comparación con el semen convencional. Si bien este resultado podría parecer insuficiente, la obtención de una mayor cantidad de animales del sexo de preferencia justificaría su utilización. La aplicación más frecuente del SS es en IA (DeJarnette y col., 2008, DeJarnette y col., 2009, Chebel y col., 2010, DeJarnette y col., 2011, Pellegrino y col., 2016), seguida por PIVE (Cran y col., 1994, Lu y col., 1999, Ferré y col., 2004, Wheeler y col., 2006, Wilson y col., 2006, Blondin y col., 2009, Xu y col., 2009, Barcelo-Fimbres y col., 2011) y en menor medida por la TE (Schenk y col., 2006, Hayakawa y col., 2009, Peippo y col., 2009, Sartori y col., 2009, An y col., 2010, Larson y col., 2010, Kaimio y col., 2013).

Hoy, el uso del semen sexado ha producido resultados consistentes en varias especies de interés zootécnico (Johnson, 1986, Johnson y Pinkel, 1986, Johnson y col., 1987a, Johnson y Clarke, 1988, Johnson y col., 1999, Johnson, 2000). Si bien el impacto económico es altamente positivo, existen algunas ineficiencias que responden a efectos colaterales del proceso de sexado sobre la viabilidad de los espermatozoides (Seidel y Garner, 2002). Como consecuencia del proceso de separación de espermatozoides portadores del cromosoma X o Y mediante citometría de flujo, la muestra seminal sexada muestra una marcada reducción de la motilidad

post-descongelado y en la vida media de los espermatozoides (Schenk y col., 1999). Esto se debe a fuerzas de presión para su avance dentro del citómetro de flujo, efecto dilución, congelamiento y posterior descongelamiento, que provocan una serie de insultos acumulados que afectan o comprometen las funciones espermáticas esenciales y la capacidad fecundante (Garner, 2001, Maxwell y col., 2004, Garner, 2006).

Está bien documentada la variabilidad entre toros en fertilización *in vitro* y en particular cuando se utiliza semen sexado (Barcelo-Fimbres y col., 2011). Esto dificulta su aplicación y expansión comercial debido a que es necesario una caracterización previa del toro originando gastos y consumo de tiempo extra. Esta variabilidad entre toros podría reducirse a niveles aceptables utilizando factores capacitantes y estimuladores de la motilidad. Existe muy poca información publicada y en gran medida desactualizada sobre avances en el uso de semen sexado en PIVE. En líneas generales, los trabajos publicados utilizan el semen sexado bajo condiciones similares que el semen convencional. Esto produjo resultados más bajos cuando comparamos semen sexado con su homólogo no sexado (Lu y col., 1999, Zhang y col., 2003, Maxwell y col., 2004, Wilson y col., 2005, Wheeler y col., 2006, Blondin y col., 2009, Xu y col., 2009). El mayor obstáculo para el semen sexado para alcanzar tasas de penetración más altas, es la baja fertilidad en comparación con el semen no sexado (Amann, 1999, Garner y Seidel, 2003, Suh y col., 2005, Seidel, 2012). Esta situación no pudo ni siquiera revertirse aumentando el número de espermatozoides por pajuela en vacas lactantes y vaquillonas (DeJarnette y col., 2010, DeJarnette y col., 2011). Las posibles causas de esta disminuida fertilidad serían una menor sobrevivencia post-descongelación, motilidad espermática, pre-capacitación e integridad acrosómica (Hollinshead y col., 2003, Suh y Schenk, 2003, Suh y col., 2005, Cran, 2007, Schenk y Seidel, 2007, Seidel, 2007, Rath y col., 2008, Frijters y col., 2009, Gosálvez y col., 2011a, Gosálvez y col., 2011b).

Cabe remarcar que pocas publicaciones han comparado el semen sexado vs. convencional del mismo eyaculado/partida y de diversos toros. Cuando los experimentos fueron planteados de esta forma, la performance del semen sexado fue menor (75-85% del control) y con variaciones entre toros (Lu y col., 1999, Lu y Seidel, 2004, Wilson y col., 2005, Wilson y col., 2006), similares a lo que sucede en condiciones de campo al realizar IA con semen sexado (DeJarnette y col., 2009, Schenk y col., 2009, Chebel y col., 2010, Norman y col., 2011).

Además del uso intensivo del SS en IA principalmente en vaquillonas vírgenes, la siguiente herramienta reproductiva donde el SS lograría un mejor desempeño sería en PIVE (Pellegrino y col., 2016). Esto estaría dado fundamentalmente a que en PIVE se logra una alta eficiencia en el uso de los espermatozoides al fertilizar en micro-gotas (pocos espermatozoides son requerido para fertilizar una gran cantidad de ovocitos) y esto permite fertilizar una gran cantidad de ovocitos, ya sea de matadero o provenientes de OPU, con una mínima cantidad de pajuelas. Esta complementación entre estas dos herramientas reproductivas resulta muy atractiva a los productores ganaderos al permitirles diluir el costo del semen sexado en múltiples hembras o donantes y aprovechar las ventajas comparativas de la PIVE (Hohenboken, 1999, Maxwell y col., 2004, Wilson y col., 2006, Garner y Seidel, 2008, Rath y Johnson, 2008, Hall y Glaze, 2014, Hansen, 2014, Lonergan y Fair, 2014).

La utilización del semen sexado en PIVE es biológicamente factible y potencialmente más eficiente en comparación con otras herramientas reproductivas (Seidel, 2003b, Maxwell y col., 2004, Blondin y col., 2009), especialmente cuando se las combina junto con la aspiración folicular - OPU - para producir descendencia genéticamente valiosa de donantes elite (Pontes y col., 2010, Macedo y col., 2013, Morotti y col., 2014). Sin embargo, varias publicaciones han reportado bajas tasas de generación de embriones competentes y transferibles. Esto estaría asociado al proceso de separación de los espermatozoides portadores del cromosoma X (Cran y col., 1994, Garner, 2006, Schenk y Seidel, 2007, Gosálvez y col., 2011b, Gosálvez y col., 2011a), lo cual afectaría la funcionalidad del espermatozoide sexado reduciendo su motilidad, alterando su dinámica de capacitación y capacidad fecundante (Seidel, 2012). Las publicaciones muestran una disminución en las tasas de fertilización, clivaje y desarrollo embrionario (ver **Tabla 6**). A los fines de minimizar estas ineficiencias se plantearon diferentes estrategias con resultados variables. Las dos principales fueron incrementar la dosis inseminante de espermatozoides y la concentración de heparina (Lu y Seidel, 2004, Blondin y col., 2009, Xu y col., 2009, Barcelo-Fimbres y col., 2011). Si bien estas mismas estrategias fueron también utilizadas con el semen no-sexado en los comienzos de la PIVE (Aoyagi y col., 1988, Fukui y col., 1990), parecería haber mayor variabilidad en la tasa de clivaje y blastocistos entre toros cuyos espermatozoides fueron sexados (Inaba y col., 2016). El potencial "efecto toro" durante la fertilización con semen sexado parecería estar relacionado al grado de impacto del proceso de sexado sobre los espermatozoides, el cual sería específico para cada toro. La manipulación del semen durante el sexado podría producir una pre-capacitación en algunos toros al inducir cambios en las membranas de los espermatozoides que aceleraran el proceso de reacción

acrosomal post-descongelado (Mocé y col., 2006). Por lo tanto, la optimización de la concentración heparina y espermatozoides puede colaborar a mejorar los resultados de fertilización y desarrollo embrionario en aquellos toros afectados por el proceso de sexado (Xu y col., 2009, Kim y col., 2013, Parrish, 2014).

A los fines de ilustrar la diferencia entre semen sexado y no sexado (convencional) en relación al desempeño en PIVE medido en relación a la tasa de fertilización o clivaje y desarrollo a blastocisto a día 7 de cultivo de la **Tabla 6**, el clivaje promedio fue de 59% (semen sexado) versus 67% (semen no-sexado), mientras que la tasa de desarrollo embrionario fue de 19% (semen sexado) contra 24% (semen no-sexado). Esto señala una eficacia del semen sexado del 88% respecto del clivaje obtenido con semen no-sexado y del 79% para el caso del desarrollo embrionario. Estos valores son coincidentes con la literatura publicada en IA en vaquillonas Holando, la cual indica que las tasas de concepción (CR) a primer servicio con semen sexado son del ~75% al 80% de las obtenidas con el semen no-sexado (Butler y col., 2014).

Tabla 6: Evolución del clivaje y desarrollo embrionario bajo distintos sistemas de producción y origen de los ovocitos fertilizados con semen sexado

Referencia	Origen Ovocitos	Semen	Capacitación	Concentración de Semen	Medio de Cultivo	Clivaje (%)	Desarrollo (%)
(Merton y col., 1997)	Matadero	Sexado	No indicado	1x10 ⁶ /ml	TCM199 + Co-cultivo + 10% FCS	52,2%	2,9% ^a
		No Sexado				58,9%	20,5% ^b
(Lu y col., 1999)	Matadero	Sexado	5 mM cafeína + 20	2x10 ⁶ /ml	CDM + BSA	71%	18% ^a
		No Sexado	µg/ml heparina			75%	25% ^b
(Zhang y col., 2003)	Matadero	Sexado	2 mM cafeína + 2 µg/	2x10 ⁶ /ml	CDM + BSA	53,1% ^a	20,3%
		No Sexado	ml heparina			69,7% ^b	22,3%
(Lu y Seidel, 2004)	Matadero	Sexado	2 mM cafeína + 10 µg/	1,5x10 ⁶ /ml	CDM + BSA	58,4%	14% ^a
		No Sexado	ml heparina			61,8%	19,2% ^b
(Wilson y col., 2006)	Matadero	Sexado	10 µg/ml heparina +	1x10 ⁶ /ml	SOF + BSA	65%	12,2% ^a
		No Sexado	PHE			67,3%	20,1% ^b
(Xu y col., 2006)	Matadero	Sexado	10 mM cafeína + 10	0,3x10 ⁶ /ml	CR1 + 10% FCS	41,8%	6,5%
		No Sexado	µg/ml heparina			51,5%	15,4%
(Bermejo-Alvarez y col., 2008)	Matadero	Sexado	10 µg/ml heparina	1x10 ⁶ /ml	SOF + 5% FCS	61,1% ^a	21% ^a
		No Sexado				84,4% ^b	40,7% ^b
(Blondin y col., 2009)	Matadero	Sexado	10 µg/ml heparina	2x10 ⁶ /ml	Menezo's B2 + Co-	80,6% ^a	10,6% ^a

		No Sexado		1x10 ⁶ /ml	cultivo + 10%FCS	68,2% ^b	22,2% ^b
(Bermejo-Alvarez y col., 2010a)	Matadero	Sexado	10 µg/ml heparina	1x10 ⁶ /ml	SOF + 5%FCS	77,1%	21,5%
(Carvalho y col., 2010)	Matadero	Sexado	No indicado	1x10 ⁶ /ml	SOF + 5%FCS	54%	16,4%
		No Sexado				55,6%	19,3%
(Peippo y col., 2010)	Matadero	Sexado	10 µg/ml heparina +	1x10 ⁶ /ml	SOF + BSA	65,3%	15,5%
		No Sexado	PHE			75%	15,9%
(Pontes y col., 2010)	OPU	Sexado	10 µg/ml heparina + PHE	1x10 ⁶ /ml	SOF + BSA	No indicado	26,1%
(Barcelo-Fimbres y col., 2011)	Matadero	Sexado	5 mM cafeína + 2 µg/ ml heparina	1x10 ⁶ /ml	CDM + BSA	69,2%	27,5%
(Presicce y col., 2011)	OPU	Sexado	10 mM cafeína + 10 µg/ml heparina	0,3x10 ⁶ /ml	CR1 + BSA	48,4%	25,2%
(Presicce y col., 2011)	Matadero	Sexado	10 mM cafeína + 10 µg/ml heparina	0,3x10 ⁶ /ml	CR1 + BSA	57,1% ^a	25% ^a
		No Sexado				75,8% ^b	39,8% ^b
(Rodriguez Villamil y col., 2012)	Matadero	Sexado	No indicado	2x10 ⁶ /ml	SOF + BSA	63,4%	12,3% ^a
		No Sexado				64,8%	19,5% ^b
(Trigal y col., 2012)	Matadero	Sexado	20 µg/ml heparina +	0,125x10 ⁶ /ml	SOF + BSA	27,4% ^a	11,9% ^a

		No Sexado	PHE			59% ^b	29,3% ^b
(Mbrotti y col., 2014)	OPU	Sexado	10 µg/ml heparina + PHE	1x10 ⁶ /ml	SOF + BSA	No indicado	29%
(Liu y col., 2015)	Matadero	Sexado	10 mM cafeína + 10 µg/ml heparina	1x10 ⁶ /ml	CR1 + 10% FCS	54,2%	24,3%
		No Sexado				77,2%	29,5%
(Lopez y col., 2015)	OPU	Sexado	10 µg/ml heparina	1x10 ⁶ /ml	SOF + BSA	58,8%	19,4%
		No Sexado				59,2%	22,7%
(Seong-Su y col., 2015)	OPU	Sexado	20 µg/ml heparina	1x10 ⁶ /ml	CR1 + BSA	36,1%	21%
(Hu y col., 2016)	Matadero	Sexado	10 mM cafeína + 10 µg/ml heparina	1x10 ⁶ /ml	CR1 + 10% FCS	82,8%	35,2%
Valores con letras diferentes en la misma columna difieren (p<0,05)							
Matadero		Sexado				61%	17%
		No Sexado				67%	24%
OPU		Sexado				48%	24%
		No Sexado				59%	23%
Sexado						59%	19%
No Sexado						67%	24%

1.4. Cultivo *in vitro* embrionario

Luego de la fecundación, la membrana nuclear del espermatozoide se rompe, se produce la sustitución de protaminas por histonas, la cromatina se descondensa y se forma una nueva membrana nuclear, dando lugar al pronúcleo masculino (PNM). Al mismo tiempo el ovocito finaliza la meiosis II, se libera el segundo corpúsculo polar, el genoma materno también se descondensa, se forma la membrana nuclear y queda constituido el pronúcleo femenino (PNF) (Hafez y Hafez, 2000a, Schatten, 2008, Florman y Fissore, 2015). Luego de la formación de los PNM y PNF, éstos migran gradualmente hacia el centro del ovocito donde se aproximan el uno con el otro. Durante este trayecto replican su ADN, se desintegran sus membranas nucleares y sus cromosomas se asocian preparándose para la primera división mitótica (Elder y col., 2010). La fusión de los pronúcleos masculino y femenino se considera el fin del proceso de fecundación y el inicio del desarrollo embrionario. En los mamíferos este proceso dura aproximadamente 12 horas (Hafez y Hafez, 2000a). Posteriormente, se forma el primer surco de segmentación, seguido de una serie de divisiones mitóticas que culminarán con la formación del blastocisto. El primer clivaje separa al cigoto en 2 blastómeros iguales o casi iguales entre 11 a 20 horas postfecundación. Estas células luego se dividen secuencialmente de forma paralela (meridional) u ortogonal (ecuatorial) al plano de clivaje inicial para generar un embrión de 4 blastómeros. Este desarrollo asincrónico de los estadios más tempranos es propio de los mamíferos. Por lo tanto, estos embriones no multiplican sus células exponencialmente desde los estadios de 2 a 4 y de 4 a 8 células, sino que es posible ver en ellos, números impares de blastómeros (Brinster, 1968, Brackett y col., 1980, Brackett, 1981, Yanagimachi, 1981, Gordon, 2004, Gardner y Lane, 2014b, Gardner y Lane, 2014a, Ramathal y col., 2015). A partir del estadio de 8 células en el ratón, 32 en el bovino y entre 32 y 64 en el ovino, el espacio intercelular comienza a reducirse, los blastómeros se agrupan y forman una esfera compacta de células. Esta organización es estabilizada por uniones estrechas que se forman entre las células exteriores de la esfera y que sellan su interior. Las células dentro de la esfera forman uniones nexa, permitiendo de este modo el paso de pequeñas moléculas e iones entre ellas. Este proceso recibe el nombre de “compactación” y da origen al estadio de mórula (Hafez y Hafez, 2000a, Ramathal y col., 2015). A partir del estadio de 16 células en hamster y cerdo, 32 células en ratón, 64 células en oveja y humano y 80 a 100 células en bovino, los blastómeros periféricos comienzan a liberar sodio hacia el interior del embrión lo que arrastra agua para mantener la isotonicidad dando lugar a la formación del blastocele y por lo tanto al estadio embrionario de blastocisto (Van Soom y col., 1992, Lonergan, 1994, Van Soom y col., 1997b, Li y col., 2010). Rodeando la nueva cavidad se

encuentra una capa de células planas llamada trofoblasto. En uno de los polos (polo embrionario) y haciendo protrusión en la cavidad blastocélica se produce una acumulación de células que se denomina macizo celular interno y que dará origen al embrión con todos los órganos del nuevo individuo, mientras que el trofoblasto formará parte de la futura placenta. Las células del trofoblasto secretan estripsina (una proteasa parecida a la tripsina) que produce una ruptura de la matriz fibrilar de la zona pelúcida permitiendo que el blastocisto se libere (eclosione) y se implante en la pared uterina (Geisert y Malayer, 2000, Hafez y Hafez, 2000a, Ramathal y col., 2015). Durante los primeros estadios de desarrollo, las células del embrión son totipotenciales, es decir, que conservan el potencial para diferenciarse en cualquier tipo celular (Campbell y Wilmot, 1997, Hochedlinger y Jaenisch, 2006, Mitalipov y Wolf, 2009, Seshagiri y col., 2009).

Durante el crecimiento intraovárico del ovocito el genoma materno es transcrito y la transcripción es almacenada. La mayoría de las transcripciones son transformadas directamente a proteínas, sin embargo, algunas permanecen silenciadas y comienzan a activarse luego de la ovogénesis producto de una cuidadosa poliadenilación. Durante la maduración meiótica los ovocitos se vuelven transcripcionalmente quiescentes y la mayoría de su ARN poliadenilado desaparece. Muchas de las proteínas maternas también son degradadas tempranamente en el desarrollo. Probablemente, sin la degradación del ARN y de las proteínas maternas la programación del desarrollo embrionario no podría ser activada. Sin embargo, esta degradación debe ser lo suficientemente selectiva como para mantener factores maternos que aseguren niveles adecuados de proteínas hasta que el genoma del embrión sea activado (Minami y col., 2007, Schier, 2007). Los eventos de síntesis celular que ocurren inmediatamente luego de la fecundación dependen de lo que se denomina “herencia materna” hasta tanto se active el genoma del embrión (Tadros y Lipshitz, 2009, Li y col., 2013, Lee y col., 2014, Zhang y Smith, 2015). La transcripción del genoma embrionario se activa en el embrión de 8 células (Barnes y Eyestone, 1990, Memili y First, 2000, Minami y col., 2007, Lee y col., 2014). Luego de la activación del genoma embrionario, los factores maternos almacenados pierden relevancia para el desarrollo preimplantacional por lo que son degradados y rápidamente reemplazados por los sintetizados a partir del nuevo genoma (Memili y First, 2000, Minami y col., 2007, Stitzel y Seydoux, 2007, Tadros y Lipshitz, 2009, Li y col., 2013). El desarrollo embrionario preimplantacional está regulado genéticamente y epigenéticamente (Levy, 2001, Morgan y col., 2005, Shi y Wu, 2009, Fedoriv y col., 2012, Cantone y Fisher, 2013, MacDonald y Mann, 2014).

El embrión bovino se desarrolla normalmente en un entorno protegido en el tracto reproductivo de la vaca. El ambiente uterino proporciona al embrión todos los nutrientes necesarios para el desarrollo temprano y un sistema para la eliminación de los materiales de desecho (Thompson y Peterson, 2000, Gordon, 2004, Gardner y Lane, 2014b, Gardner y Lane, 2014a). Gran parte de los trabajos iniciales fueron realizados en ratones y conejos (Hammond, 1949). Los primeros reportes de procedimientos exitosos se basaban en embriones *in vivo* cultivados en oviductos de ratón, conejo u oveja (Sreenan y col., 1968) para luego avanzar a al menos una etapa *in vitro*. Inicialmente, los sistemas utilizaban el cultivo *in vivo* para producir embriones basándose en oviductos de diversas especies (ratones, conejos, ovejas, vacas, entre los más populares) como soporte (Boland, 1984, Eyestone y col., 1987, Marquant-Le Guienne y col., 1989, Galli y Lazzari, 1996, Enright y col., 2000, Lazzari y col., 2010). El uso del oviducto como sistema de cultivo *in vivo* sirvió para resaltar las propiedades únicas que ofrece y el modelo a seguir para el desarrollo embrionario *in vitro* (Enright y col., 2000, Rizos y col., 2002a, Rizos y col., 2002c).

Buscando imitar a las células del oviducto se utilizó el sistema de cultivo monocapa de células epiteliales del oviducto bovino (BOEC) el cual demostró ser efectivo para producir blastocistos de origen *in vitro* (Suzuki y Foote, 1995, Abe y Hoshi, 1997) y donde un alto porcentaje de estos embriones mostraban alta calidad. Los estudios posteriores pusieron de manifiesto que no sólo las células oviductales son capaces de proporcionar un entorno propicio para el desarrollo del embrión bovino si no también una amplia variedad de otras células somáticas (Thompson y Duganzich, 1996). El análisis de unos 72 trabajos presentados en los congresos de la IETS durante el período 1991 al 1995 arrojó como conclusión que el mejor sistema de cultivo es el medio CR1 en presencia de células del hígado de rata búfalo (BRL) más el agregado de suero; obteniendo una producción promedio de 50% de blastocistos de los ovocitos divididos (Thompson y Duganzich, 1996). La introducción del co-cultivo con células del oviducto y somáticas como soporte del período de cultivo de embriones tuvo como objetivos i) superar la detención/bloqueo del desarrollo embrionario temprano, ii) aumentar la tasa de embriones producidos y iii) mejorar la calidad y congelabilidad de los embriones (Rexroad, 1989, Bongso y col., 1990, Bongso y col., 1991, Goto y col., 1992, Catt, 1994, Hawk y Wall, 1994, van Inzen y col., 1995, Plachot, 1996, Abe y Hoshi, 1997, Donnay y col., 1997, Menck y col., 1997, Duszewska y col., 2000, Orsi y Reischl, 2007, Ménéz y col., 2012). Sin embargo, el uso del co-cultivo y/o del suero fetal (FCS) estaría relacionado con alteraciones graves en el feto/ternero ocasionando en algunas circunstancias un crecimiento en tamaño desmedido (Behboodi y col., 1995, Walker y col., 1996, Numabe y col., 2000, Farin y col., 2001, Farin y col., 2006). El uso del FCS como aditivo en el

medio de cultivo embrionario sigue siendo un tema controversial. En porcentajes mayores al 10% (v/v) podría estar implicado en una reducción de las tasas de preñez y parto, y un aumento en el peso al nacer. Sin embargo, parece estimular el desarrollo embrionario fundamentalmente a partir del día 4-5 de cultivo (Hagemann y col., 1998, Thompson y col., 1998, Holm y col., 1999). Aunque se ha avanzado en el conocimiento de los requerimientos para el normal crecimiento de los embriones *in vitro* hasta la etapa de blastocisto, persiste una clara diferencia en calidad entre los embriones *in vivo* y los derivados del sistema *in vitro*. Existirían diferencias sutiles entre embriones *in vivo* e *in vitro* a nivel celular, en términos de perfiles metabólicos, ultraestructura y morfología (Massip y col., 1995, Wright y Ellington, 1995, Thompson, 1997, Khurana y Niemann, 2000b), así como también en la expresión génica (Niemann y Wrenzycki, 2000). El medio de cultivo más popular para el cultivo embrionario bovino es el fluido oviductal sintético (SOF) basado originalmente en el análisis bioquímico de fluido oviductal ovino (Tervit y col., 1972a) al cual se lo modificó posteriormente tras la incorporación de aminoácidos (Gardner y col., 1994, Steeves y Gardner, 1999b) y citrato (Keskintepe y col., 1995) y se le removió la glucosa (Takahashi y First, 1992). Los estudios de metabolismo embrionario dieron como resultado una mayor comprensión de los requerimientos energéticos y los nutrientes esenciales preferidos por embrión bovino (Pinyopummintr y Bavister, 1996b, Thompson, 1996, de Souza y col., 2015, Gardner y Harvey, 2015, Leese, 2015). Como resultado de estas investigaciones, se desarrollaron medios de cultivo “definidos” (Keskintepe y col., 1995, Gardner y col., 2000c, Summers y Biggers, 2003) y posteriormente sistemas tipo “secuencial” (o en fases) donde los componentes del medio cambian de acuerdo con los requerimientos específicos del embrión en cada etapa del desarrollo (Gandhi y col., 2000, Gardner y Lane, 2002, Lane y Gardner, 2007, Absalón-Medina y col., 2014). Hacia delante se avizora nuevos sistemas y plataformas de cultivo de embriones basados en la tecnología de microfluidos cambiando la modalidad de cultivo estático a dinámico ofreciendo como ventaja primaria la posibilidad agregar o cambiar el medio completo o de manera parcial con la idea de satisfacer los requerimientos precisos del embrión en desarrollo (Whitesides, 2006, Bormann y col., 2007, Swain y Smith, 2011, da Rocha y Smith, 2012, Smith y col., 2012). Este sistema tendría varias ventajas adicionales como poder realizar cambios graduales en la composición del medio y no tener la necesidad de retirar la placa de la incubadora para realizar cualquier cambio, evitando el shock y estrés asociado en ambas situaciones (Beebe y col., 2002).

La obtención de los primeros terneros obtenidos por la producción totalmente *in vitro* es relativamente reciente (Goto y col., 1988). El mayor progreso en PIVE ha sido el área del

metabolismo y requerimientos por parte de las gametas y embriones. Esto trajo aparejado la posibilidad de formular medios de cultivo que atendieran esas necesidades y de esta forma, lograr producir más y mejores embriones (Bavister, 2002, Hoshi, 2003, Hansen, 2006).

La correcta selección y preparación de los medios de cultivo es de extrema importancia, ya que puede condicionar el éxito de la maduración de ovocitos, fertilización y el posterior desarrollo de los embriones (Sirard y col., 1988, Gliedt y col., 1996, Gandhi y col., 2000). Básicamente, existen dos sistemas de cultivo de embriones luego de producida la co-incubación de ovocitos maduros y los espermatozoides. Un sistema consiste en co-cultivar los embriones con diversos tipos de células como soporte (células epiteliales del oviducto, células de la granulosa, células del hígado de rata, entre otras) utilizando medios de diversa complejidad (CR1, TCM-199, Ménézo's B2, entre otros) (van Inzen y col., 1995, Reed y col., 1996, Thompson y Duganzich, 1996, Donnay y col., 1997, Menezo y col., 1998, Hasler, 2000). El otro sistema no utiliza células soporte y generalmente es un medio más simple y definido. Uno de los medios más populares en el cultivo embrionario bovino es el fluido de oviducto sintético (SOF) suplementado, en diversos grados, con aminoácidos, vitaminas, albúmina y otros componentes (Tervit y col., 1972a, Fukui y col., 1991, Edwards y col., 1997, Holm y col., 1999, Krisher y col., 1999).

El campo del cultivo de embriones moderno ha tenido un importante avance en la última década debido al resurgimiento del interés en la fisiología y metabolismo del embrión lo cual produjo mejoras muy significativas (Bavister, 1995, Gardner y Lane, 1997). En consecuencia, es importante analizar la fisiología y el metabolismo del embrión en desarrollo con el fin de evaluar el desarrollo y la eficacia de los diferentes sistemas de cultivo de manera global (Gardner, 2008). Es importante resaltar que el término “embrión viable” se utiliza de manera frecuente en las publicaciones y que viabilidad de los blastocistos producidos en los actuales sistemas de cultivo puede ser extremadamente diferente. La viabilidad se define como la capacidad del blastocisto para implantarse y desarrollarse satisfactoriamente en feto (Gardner y Lane, 2014a). Durante el período de desarrollo embrionario preimplantacional, el embrión sufre cambios significativos en su fisiología, metabolismo y control genético. Estos cambios son tan significativos que el cigoto (punto de partida del desarrollo) y el blastocisto (punto final de la etapa preimplantacional), son completamente diferentes desde el punto de vista metabólico (Leese, 1993, Gardner y Harvey, 2015, Leese, 2015). El ovocito y el cigoto, tienen una actividad metabólica baja, exhiben niveles bajos de consumo de oxígeno. En lugar de utilizar glucosa como fuente de energía primaria, el cigoto y durante los primeros estadios de clivaje, utilizan piruvato, lactato y glutamina (Biggers y

Stern, 1973, Biggers y Borland, 1976, Rieger y col., 1992b, Gardner, 1998, Krisher y Bavister, 1998b) con niveles relativamente bajos de glucólisis. Antes de la compactación, el embrión en cultivo se beneficia de la presencia de aminoácidos específicos como por ejemplo alanina, aspartato, asparagina, glicina, glutamato, glutamina, prolina y serina (Steeves y Gardner, 1999b, Van Winkle, 2001). Estos aminoácidos han mostrado estimular el clivaje y compactación (Lee y Fukui, 1996, Lee y col., 2004), precursores de la síntesis proteica (Crosby y col., 1988), fuentes de energía (Rieger y col., 1992a, Rieger y col., 1992b), reguladores del metabolismo energético (Gardner, 1998, Sinclair y col., 2003), osmoregulación (Van Winkle, 2001), buffer del pH intracelular (Edwards y col., 1998, Lane, 2001, Van Winkle, 2001), antioxidante (Liu y Foote, 1995), agente quelante (Orsi y Leese, 2004), señalización (Van Winkle, 2001, Martin y col., 2003), regulación de la diferenciación (Lane y Gardner, 1997b). Un cambio importante en el embrión se produce en el momento de la compactación (Pike, 1981, Sinclair y col., 2003). Al producirse la compactación, el embrión crea activamente un blastocelo (Watson y Barcroft, 2001) y durante esta etapa, el blastocisto tiene una alta capacidad oxidativa y utiliza glucosa como fuente de energía primaria, aunque es capaz de adaptar y utilizar fuentes de nutrientes alternativas si fuese necesario (Rieger, 1992, Takahashi y First, 1992, Thompson y col., 1996, Leese, 2012). El blastocisto presenta una capacidad de glucólisis aeróbica convirtiendo glucosa en lactato (Rieger, 1992, Thompson y col., 1996, Khurana y Niemann, 2000b). En este punto, el embrión tiene dos tipos de células distintas, la masa celular interna y el trofoectodermo, que presentan diferentes requerimientos de hidratos de carbono (Thompson, 1996, Thompson y col., 1996, Houghton, 2006) y de aminoácidos (Rosenkrans y First, 1994, Partridge y Leese, 1996, Pinyopummintr y Bavister, 1996a, Steeves y Gardner, 1999b, Sturmey y col., 2010). Así como ocurren cambios en la fisiología y metabolismo del embrión, el medio ambiente del tracto reproductivo femenino también presenta diferencias en una misma región debido a los cambios endócrinos (Hugentobler y col., 2008, Hugentobler y col., 2010) y diferencias aún mayores entre regiones del tracto reproductivo como por ejemplo entre el oviducto y el útero (Gardner y col., 1996, Harris y col., 2005, Lee y Yeung, 2006). Por tanto, el embrión está expuesto a diferentes gradientes de nutrientes (tanto hidratos de carbono y aminoácidos), oxígeno y pH, durante el desarrollo *in vivo*. Estos gradientes de nutrientes no son pasivos y pueden regular el metabolismo (Bavister, 1995, Leese, 1995, Barnett y Bavister, 1996, Lane y Gardner, 2000) y la viabilidad del embrión (Gardner y col., 2000c, Leese y col., 2008a). Esto a su vez tiene consecuencias para el desarrollo de medios de cultivo, donde el foco estaría centrado en colocar al embrión en un medio que ocasione el menor estrés metabólico mientras que en la situación *in*

vivo, el embrión está expuesto a un gradiente de nutrientes y fuentes energéticas variables (Gardner y Lane, 2014a).

Diferentes condiciones de cultivo se han utilizado para cada etapa del proceso fertilización *in vitro* (maduración, fecundación y cultivo) (Brackett, 1973, Brackett y col., 1978, Bavister, 1981, First y Parrish, 1987, Parrish y First, 1991, Bavister, 2002, Schatten, 2008) mientras que el concepto de medios secuenciales fue diseñado específicamente para cubrir los requerimientos cambiantes del embrión durante el período de cultivo (Thompson, 1996, Gardner y Lane, 1997, Thompson y Peterson, 2000, Lane y Gardner, 2007). El diseño de los medios secuenciales se basó en la dinámica de la fisiología embrión y su metabolismo, la minimización del estrés intracelular y en el cambiante medio ambiente entre el oviducto y el útero donde las secreciones y atmósfera de gas son marcadamente diferentes (Biggers y col., 2005, Biggers y Summers, 2008, Hugentobler y col., 2008, Hugentobler y col., 2010). Varios medios secuenciales de cultivo embrionario han sido publicados: Early-SOF/Late-SOF (Thompson, 2000, Lim y col., 2007, Rho y col., 2007), SOFC1/SOFC2 (Gandhi y col., 2000), G1/G2 (Krisher y col., 1999, Lane y col., 2003a, Gardner y Lane, 2014b) y CDM-1/CDM-2 (Olson y Seidel, 2000). Los medios secuenciales o en dos etapas también pueden implicar la adición y sustracción de componentes particulares del medio basal en cada fase del cultivo (Gardner y Lane, 1998, Thompson y col., 1998, Lane y col., 2003a, Quinn, 2012) o el uso de un medio de cultivo diferente en cada fase (KSOM/SOF) (Nedambale y col., 2004a, Nedambale y col., 2004b, Nedambale y col., 2006b).

Los medios de cultivo de una etapa o “monocultivo” bovino tales como el CR1 (Rosenkrans y First, 1994), SOF (Tervit y col., 1972a), BECM (Lim y col., 1999), KSOM (Yang y col., 1994, Liu y Foote, 1995, Summers, 2013), IVD101 (Abe y Hoshi, 2003, Hoshi, 2003) suelen presentarse en dos variantes: sin recambio (Holm y col., 1999, Holm y col., 2002) o con recambio cada 48 h generalmente para evitar la acumulación de sustancias tóxicas (Trounson y col., 1994, Carolan y col., 1995, Moore y col., 2007).

Otros medios secuenciales son el resultado del agregado de EDTA (Gardner y col., 2000b), taurina (Guyader-Joly y col., 1998, Devreker y col., 1999) y aminoácidos no esenciales (Gardner, 1998, Thompson, 2000, Van Winkle, 2001) en la primera fase; mientras que, glucosa (Kim y col., 1993a, Matsuyama y col., 1993), ácido hialurónico (Stojkovic y col., 2002), aminoácidos esenciales y no esenciales (Thompson, 1996, Thompson, 2000) y suero en la segunda etapa de cultivo (Thompson y col., 1998). Una práctica habitual es el agregado de albúmina sérica bovina

(BSA) durante la primera fase y con suero en la segunda fase de cultivo, como fuente proteica, entre otros (Wang y col., 1997). Otras funciones de éstas macromoléculas son la de proteger a los embriones en cultivo de sustancias tóxicas, aportar factores de crecimiento y ciertas hormonas y reducir la tensión superficial del medio, evitando que los embriones se adhieran al instrumental (Mucci y col., 2006b). Se ha observado que la adición de suero a los medios de cultivo tiene un efecto bifásico sobre el desarrollo embrionario, inhibiendo los primeros estadios y estimulando el desarrollo de mórulas y blastocistos (Bavister y col., 1992, Pinyopummintr y Bavister, 1994, Van Langendonck y col., 1997, Yoshioka y col., 1997). La inclusión de suero al medio de cultivo estaría relacionado con una aceleración del desarrollo embrionario (Hagemann y col., 1998, Holm y col., 1999, Gomez y Diez, 2000, Holm y col., 2002), un número mayor de células embrionarias (Pinyopummintr y Bavister, 1994, Van Langendonck y col., 1997) y a una mejora en la tasa de producción y eclosión (Wang y col., 1997, Hagemann y col., 1998, Gomez y Diez, 2000). Sin embargo, la incorporación de suero en alta proporción (>5% v/v) y desde el inicio del período de cultivo tendría un efecto negativo fundamentalmente en la congelabilidad de los embriones producidos *in vitro* (Massip, 2001, Rizos y col., 2001, Abe y col., 2002, Rizos y col., 2003, Mucci y col., 2006a).

A fin de lograr un alto desarrollo embrionario, algunos laboratorios utilizan co-cultivo con células somáticas, medios acondicionados, y/o medios con suero. En el sistema de co-cultivo, los embriones son incubados en contacto con células somáticas, mientras que en los medios acondicionados se enriquece el medio de cultivo por contacto con células del cumulus u oviductales previo al cultivo de los embriones. Si bien estos sistemas de cultivo pueden resultar en elevados porcentajes de formación de blastocistos, el cultivo celular puede cambiar/alterar los sustratos disponibles para el embrión, y de esta forma, modificar las concentraciones iniciales en el medio de cultivo original (Gardner y Lane, 2003, Gardner y Lane, 2014a). El suero podría introducir en los medios de cultivo cantidades variables de factores con efectos positivos y negativos sobre el desarrollo embrionario (Pinyopummintr y Bavister, 1994). La variabilidad del suero podría originarse en el tipo, edad y estado fisiológico del donante y la forma de preparación del suplemento. De esta forma, la presencia y concentración de algunos de los componentes del suero puede variar entre lotes. Esto ocasiona que la composición final de los medios (IVM y IVC, principalmente) cambie entre preparaciones y afectar la repetitividad de los resultados y sus consiguientes validaciones e inferencias. En ausencia del suero, la BSA (ej. Sigma-Aldrich A8806 o A6003) aportaría los requerimientos metabólicos necesarios a los embriones especialmente en los estadios tempranos (Krisner y col., 1999), evitando la

exposición innecesaria a factores potencialmente inhibitorios del suero. El suero a bajas concentraciones (<5% v/v) no produciría daño mitocondrial, no reduciría la actividad mitocondrial o incrementaría el área cubierta por lípidos en embriones bovinos de 2 a 16 células cultivados *in vitro*, respecto del cultivo sin suero (Crocco y col., 2013). Según esta última publicación, el mejor momento del cultivo para agregar suero al medio de cultivo sería en el día 3 de cultivo ya que promueve la actividad mitocondrial al día 4, sin exhibir acumulación de lípidos.

Recientemente se han publicado varios trabajos proponiendo diferentes moléculas de origen sintético (incluso recombinantes) capaces de remplazar el FCS y la BSA con el objetivo de estandarizar el sistema de producción *in vitro* evitando diferencias entre lotes, reducir el riesgo sanitario, mejorar la criotolerancia y otros fenómenos asociados como el sobrepeso de las crías (LOS), alargamiento de la gestación, distocia, abortos, muerte perinatal, entre otros (van Wagtenonk-de Leeuw y col., 1998, Abe y col., 2002, Neira y col., 2010, Moreno y col., 2015). Entre éstas moléculas podemos nombrar: polivinil alcohol (PVA) (Lim y col., 2007), polivinilpirrolidona (PVP) (Chung y col., 2007), ácido hialurónico (HA) (Stojkovic y col., 2002, Palasz y col., 2006), factores de crecimiento (IGF, EGF, ITS, GM-CSF) (Neira y col., 2010), albúmina recombinante (Lane y col., 2003b) y suero sintético (Chanson y col., 2001, Duque y col., 2003, Moore y col., 2007, Sagirkaya y col., 2007). Si bien el desarrollo de un sistema de cultivo definido (o al menos semi-definido) que evite o minimice los efectos del FCS y BSA sería altamente deseable, la mayoría de los resultados publicados hasta el momento provienen de experimentos *in vitro* (con ovarios de matadero) mostrando tasas de divaje, desarrollo, sobrevivencia a la congelación, eclosión y expresión génica. Resta comprobar su efecto post-transferencia, gestación, parto y post-parto.

Actualmente, existen dos puntos de vista opuestos acerca de la composición del medio de cultivo "ideal": medio secuencial (Quinn, 2012) y el medio monocultivo (Machtinger y Racowsky, 2012). El medio secuencial (o de dos etapas) trata de imitar las condiciones *in vivo*, cuando el cigoto se mueve desde el oviducto hacia el útero durante el desarrollo temprano (Paternot y col., 2010). Con el fin de satisfacer las necesidades del embrión en cada momento en el desarrollo y para optimizar la calidad de los embriones, el medio secuencial contiene una composición diferente durante diferentes días de cultivo (Gardner y col., 2000a, Gardner y Lane, 2002, Gardner, 2008). La composición "ideal" del medio secuencial se basa en la información generada sobre el cambio de consumo de nutrientes y energía a medida que el embrión evoluciona con el tiempo durante el período de cultivo preimplantacional (Thompson, 1997, Biggers y Summers, 2008, Gardner,

2008). A esto se le suma que ciertas moléculas como el EDTA, glutamina y algunos aminoácidos tienen un efecto variable (inhibitorio o estimulante) sobre el embrión dependiendo del momento de desarrollo (Partridge y Leese, 1996, Steeves y Gardner, 1999b, Gardner y col., 2000b). En el sistema de monocultivo, el embrión se cultiva en un medio que contiene todos los componentes necesarios para el desarrollo embrionario y la composición de este medio no cambia durante el cultivo de embriones (Biggers y Summers, 2008). Los usuarios de este medio argumentan que el embrión tendría la capacidad de “elegir” los nutrientes que necesita y descartar los que no, y además se evitaría perturbar la placa de cultivo. Al momento la evidencia no muestra claramente a un sistema de medio superior al otro (Biggers y col., 2005, Biggers y Summers, 2008). Ambos sistemas han mostrado óptimo desarrollo y calidad embrionaria al momento de la transferencia. Tanto el sistema secuencial (Lane y col., 2003a, Quinn, 2012) como el monocultivo (Holm y col., 1999, Machtinger y Racowsky, 2012) han reportado resultados satisfactorios respecto a la tasa de desarrollo y calidad embrionaria. Sin embargo, pocos estudios han estudiado y evaluado la tasa de implantación, preñez y nacimientos entre medios de cultivo secuencial y monocultivo (Nedambale y col., 2004a, Moreno y col., 2015).

Cabe remarcar que el sistema de medio de monocultivo está ganando popularidad nuevamente en el ámbito de los laboratorios FIV humanos. El medio monocultivo incluye todos los ingredientes necesarios para mantener el desarrollo del embrión hasta la etapa de blastocisto y se basa en la teoría de permitir que el embrión elija los nutrientes, vitaminas, aminoácidos, minerales y los demás componentes necesarios para mantener un desarrollo óptimo durante todo el período de cultivo (Gardner y Lane, 2014a). Sabiendo que el peor enemigo de los embriones son las fluctuaciones, en particular del pH y la temperatura (Swain, 2010), un sistema de medio monocultivo tendría la ventaja de disminuir el número de manipulaciones y el tiempo que el embrión está fuera de la incubadora. Otro punto a resaltar son los factores autocrinos/paracrinos que el embrión produce durante el desarrollo temprano los cuales actuarían no solo el embrión en sí mismo sino también de manera cooperativa con los embriones adyacentes (Gandolfi, 1994, Gopichandran y Leese, 2006). El efecto estimulante de estos factores podría licuarse en un sistema de cultivo secuencial.

La gran mayoría de los ovocitos madurados *in vitro* se obtienen de folículos antrales tempranos y por lo tanto ovocitos meióticamente competentes. Sin embargo, muchos no alcanzan un diámetro óptimo, la maquinaria citoplasmática no ha completado o presentan anomalías inducidas por medios de cultivo inapropiados o incompletos que afectan el posterior desarrollo

embrionario, el número de células del blastocisto y su la calidad, su capacidad para implantarse, mantener la preñez y llegar a término al nacimiento (Bavister, 1995, Biggers, 2002, Gordon, 2004, Hansen, 2006, Lonergan y Fair, 2008, Cohen y Rieger, 2012, Gardner y Lane, 2014b). La evidencia sugiere que la calidad intrínseca del ovocito es el factor clave que determina la proporción de ovocitos que desarrolla a la etapa de blastocisto. La maduración de ovocitos es un proceso complejo y la selección de los COCs, a través de su morfología, no es suficiente para obtener mejores tasas de maduración y fecundación (de Loos y col., 1989, Sirard y Blondin, 1998, Barnes y Sirard, 2000, Krisher, 2004, El-Raey y Nagai, 2014). Hay considerable evidencia de que el medio y las condiciones de cultivo también influyen en el desarrollo de embriones bovinos *in vitro*. Estos procesos implican numerosos niveles de chequeo, control de calidad y son sensibles a la regulación de los factores endógenos y exógenos (Fukui y col., 1991, Lonergan y col., 2001, Mayer y col., 2003, Camargo y col., 2006, Lane y col., 2008). El medio ambiente en el que se desarrolla el embrión *in vitro* difiere sustancialmente del que existe en condiciones *in vivo*. Durante su desarrollo *in vitro* los embriones se ven expuestos a choques térmicos, fuentes luminosas, atmósfera gaseosa (5% de CO₂ en aire) y condiciones de cultivo estáticas caracterizadas por una importante cantidad de medio rodeando al embrión que puede aportar un exceso, o bien carecer de los nutrientes necesarios (Krisher y Bavister, 1998b, Bavister, 2000, Thompson, 2000, Leese y col., 2008a, Vajta y col., 2010, Gardner y Lane, 2014b, Chronopoulou y Harper, 2015, Gardner y Harvey, 2015, Leese, 2015). Estas condiciones de cultivo permiten obtener <40% de embriones viables al día 7, en relación a los ovocitos puestos a madurar (Lonergan y col., 2001, Galli y col., 2003, Hansen, 2006). La tasa de producción de blastocistos parecería aumentar sustancialmente (>60%) cuando se mejora y sincroniza la maduración nuclear y citoplasmática (Hussein y col., 2006, Gilchrist y Thompson, 2007, Gilchrist y col., 2008, Albuz y col., 2010, Gilchrist y col., 2015, Lonergan y Fair, 2016) y/o cuando se sincroniza y estimula el desarrollo folicular mediante FSH (Blondin y col., 2002, Nivet y col., 2012, Días y col., 2014) 44-68 hs antes de realizar OPU. El cultivo *in vitro*, esto es, la atmósfera, el medio, los suplementos y la plataforma de soporte embrionario afecta el desarrollo embrionario y por ende condiciona la capacidad de los embriones a implantarse y resistir las bajas temperaturas durante el congelamiento (Fukui y col., 1991, Carolan y col., 1995, Massip y col., 1995, Holm y Callesen, 1998, Massip, 2001, Abe y col., 2002, Imai y col., 2002, Vajta y Kuwayama, 2006). En la **Tabla 7** se observan algunas de las diferencias encontradas entre ambos tipos de embriones.

Tabla 7: Diferencias entre embriones bovinos producidos *in vivo* e *in vitro* (Greve y col., 1993, Leibo y Loskutoff, 1993, Pollard y Leibo, 1993, Pollard y Leibo, 1994, Farin y col., 1995, Massip y

col., 1995, Wright y Ellington, 1995, Van Soom y col., 1997a, Van Soom y col., 1997b, Holm y Callesen, 1998, Abe y col., 1999a, Boni y col., 1999, Khurana y Niemann, 2000b, Crosier y col., 2001, Holm y col., 2002, Rizos y col., 2002a, Rizos y col., 2002c, Ushijima y col., 2008, McHughes y col., 2009)

<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
Alta tasa de incorporación de amino ácidos	Baja tasa de incorporación de amino ácidos
Alta tasa de oxidación de glucosa a CO ₂	Baja tasa de oxidación de glucosa a CO ₂
Baja ocurrencia de polispermia	Alta ocurrencia de polispermia
Baja presencia de mitocondrias anormales y degeneradas	Alta presencia de mitocondrias anormales y degeneradas
Baja producción de lactato	Alta producción de lactato
Baja tasa de producción de amonio	Alta tasa de producción de amonio
Bajo grado de vacuolización del citoplasma en los blastómeros	Alto grado de vacuolización del citoplasma en los blastómeros
Blastómeros regulares	Blastómeros irregulares
Compactación evidente de mórulas	Compactación no evidente
Completa oscuridad	Exposición a la luz (lupa, microscopio, etc.)
Espacio perivitelino grande	Espacio perivitelino pequeño
Expresión génica normal	Expresión génica alterada
Intercambio permanente y dinámico entre el embrión y su madre	Condiciones de cultivo estáticas
Intercambios dinámicos permanentes entre el embrión y el medio	Condiciones de cultivo estáticas, presencia excesiva o ausencia de algunos metabolitos
Largo de gestación normal	Incremento en la duración de la gestación
Mayor densidad	Menor densidad
Mayor masa celular interna (MCI)	Menor MCI
Mayor nro. y tamaño de complejos de unión entre las células de MCI y células trofoblásticas (CT)	Menor nro. y tamaño de complejos de unión entre las células de MCI y CT
Mayor relación MCI:CT	Menor relación MCI:CT
Mayor tasa de oxidación de glucosa en blastocistos	Mayor tasa de oxidación de glucosa en mórulas
Menor/bajo número de cromosomas anormales	Mayor/alto número de cromosomas anormales

Menor presencia de lípidos	Mayor presencia de lípidos
No hay bloqueo en el desarrollo	Si hay bloqueo en el desarrollo (estadio de 8 células)
No hay fragmentación del citoplasma	Si hay fragmentación del citoplasma
Normal desarrollo fetal	Mayor desarrollo fetal
O ₂ y CO ₂ controlado	Exposición directa al gas atmosférico
Oscuridad total	Exposición a luz diurna y del microscopio
Pequeñas cantidades de fluidos del oviducto rodean al embrión	Gran cantidad de medio sintético rodea al embrión
Peso al nacimiento normal	Incremento del peso al nacer
Presiones de O ₂ y CO ₂ controladas	Exposición directa a la atmósfera gaseosa
Temperatura corporal constante	Choques térmicos
Temperatura de desarrollo constante	Shock térmico
Volumen mínimo de secreciones genitales rodeando al embrión	Volumen importante de medio de cultivo rodeando al embrión
ZP de difícil disolución ante tratamientos enzimáticos	ZP fácilmente disuelta

El sistema de cultivo funciona cuando se tiene presente todos los aspectos del proceso en su conjunto y cómo interaccionan entre sí. Esto es, no solo es importante el medio de cultivo propiamente dicho si no también el ambiente gaseoso, volumen de incubación y número de cigotos/embriones en cada gota, tipo y cantidad de suplementación de macromoléculas, entre otros (Gardner, 2008, Houghton, 2012, Kovačič, 2012, Meintjes, 2012, Reed, 2012, Zander-Fox y Lane, 2012). El cultivo de embriones en volúmenes de medio reducidos y/o en grupos aumenta significativamente la tasa de desarrollo embrionario (Paria y Dey, 1990a, Donnay y col., 1997, Fujita y col., 2006, Hoelker y col., 2010, Reed, 2012, Wydooghe y col., 2014), aumenta el número de células del blastocisto (O'Doherty y col., 1997, Khurana y Niemann, 2000a) y su viabilidad (Marquant-Leguienne y Humblot, 1998, Senatore y col., 2010). El efecto promotor del desarrollo embrionario post compactación cuando más embriones son cultivados en la misma gota esta también relacionado con el tamaño de la misma (Keefer y col., 1994, Carolan y col., 1996, O'Doherty y col., 1997). Se ha propuesto que el beneficio que experimentan los embriones cuando son cultivados en volúmenes pequeños y/o en grupos se debe a la producción y liberación de factor/es específico/s provenientes de los de embriones con efecto autocrino y

paracrino que estimulan el desarrollo (Paria y Dey, 1990a, Gandolfi, 1994, Gopichandran y Leese, 2006, Richter, 2008, Hegde y Behr, 2012). El cultivo de los embriones en un volumen grandes de gota produciría un efecto dilución de éstos factores (Gardner, 1994, Ahern y Gardner, 1998). Este fenómeno no se limita solamente a las especies multiovulatorias como el ratón (Lane y Gardner, 1992, Salahuddin y col., 1995) o el cerdo (Stokes y col., 2005), sino también en especies monovulatorias como la oveja (Gardner y col., 1994), la vaca (Donnay y col., 1997, Fujita y col., 2006), y el humano (Ebner y col., 2010). Se ha demostrado, tanto en el ratón como en el bovino que el aumento de la relación embrión:gota estimula específicamente el desarrollo de la MCI (Ahern y Gardner, 1998).

Existe hoy un debate interesante sobre el cultivo de embriones ya sea en grupos o de forma individual (Sugimura y col., 2010, Kirkegaard y col., 2015, Carrocer y col., 2016). La identificación de los embriones con mayores posibilidades de implantarse en el útero es fundamental en los tratamientos de fertilización *in vitro* en humanos. Reconocer con exactitud a esos embriones con mayor potencial de implantarse ayuda a minimizar los riesgos de embarazos múltiples los cuales están asociados a un mayor riesgo de morbilidad materna y fetal. Diversos estudios han demostrado la existencia de una relación entre la morfología de los embriones y la tasa de implantación (Shulman y col., 1993). Sin embargo los criterios de selección de embriones basados únicamente en rasgos morfológicos resultan insuficientes y por ello se están explorando la utilidad de otras características tales como la morfología de los pronúcleos, el ritmo de desarrollo *in vitro*, niveles de antígeno G leucocitario en el medio de cultivo, biomarcadores en el líquido folicular, entre otros (Scott y col., 2000, Noci y col., 2005, Sakkas y Gardner, 2005, Botros y col., 2008, Chen y col., 2013, Montag y col., 2013). El seguimiento del ritmo de desarrollo embrionario *in vitro* por un sistema de video cámara computarizado parece ser una alternativa para identificar los embriones más adecuados para transferir (Basile y Meseguer, 2012, Sugimura y col., 2012, Kirkegaard y col., 2015). La selección de los embriones a transferir se debe realizar minimizando la exposición de los embriones a condiciones desfavorables, ya que la apertura de las incubadoras de manera frecuente causa desequilibrios en su ambiente que alteran la temperatura, humedad, pH del medio de cultivo, y que pueden demorar bastante en volver a la normalidad. El sistema de video computarizado dentro de la incubadora representa una alternativa para evaluar el ritmo de desarrollo de los embriones de manera continua sin perturbarlos. Pero este sistema está basado en el cultivo individual de embriones. El cultivo de embriones de manera grupal o individual tiene cada uno ventajas y desventajas (**Tabla 8**).

En los últimos años, la producción de blastocisto ha ido mejorado por la implementación de varias estrategias tales como el co-cultivo de embriones con células somáticas adultas autólogo o heterólogos, líneas celulares establecidas las líneas celulares (Bongso y col., 1991, Goto y col., 1992, Catt, 1994, Duszewska y col., 2000, Ménéz y col., 2012), el uso de medios de cultivos secuenciales libre de suero (Gardner, 1998, Olson y Seidel, 2000, Quinn, 2012), el cultivo briones en volúmenes medio reducidos (Salahuddin y col., 1995, Nagao y col., 1998, Hbelker y col., 2009, Hbelker y col., 2010, Sugimura y col., 2013) y el cultivo en grupo (O'Doherty y col., 1997, Ahern y Gardner, 1998, Ward y col., 2000a, Fujita y col., 2006, Senatore y col., 2010, Reed y col., 2011, Wydooghe y col., 2014).

Tabla 8: Cultivo en grupo de embriones. Potenciales ventajas y desventajas (Reed y col., 2011)

Ventajas	Desventajas
La acumulación de factores embriotróficos secretados por los embriones de alta calidad podría mejorar o favorecer la competencia de todos los embriones	La acumulación de factores de embriotóxicos secretados por embriones de baja calidad podría disminuir la competencia de los embriones cercanos
	Los requerimientos de cada embrión son únicos y pueden verse influenciados negativamente al agotarse nutrientes esenciales
	No es factible realizar un seguimiento de los embriones de manera individual a los fines de poder realizar una mejor selección por calidad, a través de la tasa de desarrollo, normalidad de los blastómeros o de perfiles metabólicos
	No se puede cultivar embriones biopsiados

El desafío de optimizar las condiciones de cultivo para lograr maximizar la tasa de desarrollo de blastocistos viables ha llevado a replantear las condiciones de cultivo a los fines de lograr mayor productividad y alcanzar congelar más embriones PIVE (Marquant-Leguienne y Humblot, 1998, Fleming y col., 2004, Hansen, 2006, Lonergan y Fair, 2008, Absalón-Medina y col., 2014). Una de las principales razones del cultivo en grupo sería la modificación del microambiente por parte de los embriones debido a la secreción de factores estimulantes del crecimiento (Paria y Dey, 1990a, Gandolfi, 1994, Richter, 2008, Senatore y col., 2010, Hegde y Behr, 2012). Sin embargo,

otros factores tóxicos o sustancias inhibitoras derivados de embriones de mala calidad o que hayan iniciado un proceso de degradación pueden tener influencias negativas sobre los embriones vecinos en la microgota (Tao y col., 2013). Estos embriones podrían competir con los embriones viables por los nutrientes esenciales limitando o reduciendo su acceso (Reed y col., 2011, Absalón-Medina y col., 2014). Por lo tanto, durante el cultivo *in vitro* preimplantacional podría haber un beneficio en la distribución de embriones en la microgota de acuerdo a la su calidad, grado de progresión en el desarrollo y división celular (Jones y col., 1998, Tao y col., 2013, Wydooghe y col., 2014).

Reportes contradictorios sugieren que el cultivo de 1 embrión en una gota 10 μ l presenta un desarrollo significativamente menor en comparación con 10 embriones cultivados en una gota 50 μ l (28,0% vs. 45,9%) (Blondin y Sirard, 1994). Resultados similares fueron encontrados al cultivar 1 embrión por microgota (0% de desarrollo), de 3 a 6 embriones/microgota logró 6% mientras que 23% de blastocisto se produjo cuando 20 embriones fueron cultivados en la misma microgota (Donnay y col., 1997). Otros trabajos mostraron un efecto favorable al aumentar la densidad de embriones ya sea disminuyendo el volumen de medio de cultivo o incrementando el número de embriones incubados por unidad de volumen (Yuan y col., 2000, Gordon, 2003c, Wydooghe y col., 2014). También se ha intentado utilizar al co-cultivo con células somáticas como refuerzo cuando se cultivan pocos ovocitos con resultados insatisfactorios (Hendriksen y col., 1999), aunque la calidad del embrión sí mejoraría al agregar el co-cultivo de igual manera que cuando se disminuye el volumen de medio (Donnay y col., 1997). La adición de factores de crecimiento al medio de cultivo parecerían tener un efecto positivo en los embriones bovinos (Flood y col., 1993, Thibodeaux y col., 1995a, Thibodeaux y col., 1995b, De Moraes y Hansen, 1997, Olson y Seidel, 2000), aunque solo sería significativamente efectiva si se cultivaron los embriones en alta densidad (>25-30 embriones por microgota) (Keefer y col., 1994, Paula-Lopes y col., 1998). La acción cooperativa entre los embriones cultivados en grupos grandes ha sido descrita de manera extensa por varios investigadores (Paria y Dey, 1990a, Keefer y col., 1994, Ahem y Gardner, 1998, Nagao y col., 2008); aunque este efecto positivo también se evidencia durante la IVM cuando los ovocitos son madurados en grupos mayores a 30 por gota (Katska y col., 1998). En situaciones como OPU-PIVE donde se recuperan pocos ovocitos en promedio por donante (Merton y col., 2003), el cultivo en pequeñas gotas (10-12 μ l) con el agregado de suero en el día 5 de cultivo conducía a un aumento significativo en el rendimiento de blastocisto (Hagemann y col., 1998). Otra estrategia reportada para mejorar el desarrollo de blastocistos ante un escenario de baja densidad (de uno a cinco embriones por microgota) propone la

reducción de la tensión de oxígeno entre 1-2,5% durante el período de cultivo o la exclusión de fosfato del medio de cultivo (Nagao y col., 1998, Nagao y col., 2008). El número de embriones en cultivo no solo afecta la tasa de desarrollo si no también la liberación de interferón tau (IFN- τ) (Larson y Kubisch, 1999). Sistemas de producción de embriones individuales en medios definidos presentan un desafío importante (Fukui y col., 2000). Otros estudios mostraron que, además de la menor producción de embriones en el cultivo individual, la tasa de eclosión también se ve afectada de manera significativa (Yuan y col., 2000). La tasa de producción de blastocistos se maximiza cuando el número de embriones en la gota de cultivo es mayor a cinco, siendo el óptimo en términos de cantidad y calidad cuando el tamaño del grupo supera los 25 embriones por gota (Ward y col., 2000a). Además de esta conclusión, el trabajo dejó claro que el número de embriones por gota, es el factor que más influye en la tasa de desarrollo y calidad de los blastocistos en lugar del volumen de medio. La respuesta cooperativa entre embriones también parecería operar cuando ovocitos de mala o baja calidad son cultivados en grupos mayores a 40 por gota, situación donde la tasa de desarrollo mejoró significativamente (Khurana y Niemann, 2000a).

El objetivo final de las técnicas de reproducción asistida es la multiplicación de reproductores seleccionados a través del nacimiento de crías sanas. A pesar del rápido progreso en este campo, el nivel de ineficiencia sigue siendo alto (solo un 40% de los ovocitos puestos en cultivo llega a blastocisto) (Lonergan y Fair, 2008, Lonergan y Fair, 2014). El microambiente *in vitro* y los medios de cultivo donde se desarrollan los embriones no reflejan las mismas condiciones que se encuentran en el tracto reproductor femenino. La definición de los nutrientes, factores de crecimiento y sustratos óptimos para todo el proceso de producción *in vitro* de embriones conduciría a una mejor comprensión de los puntos críticos para el desarrollo embrionario temprano preimplantacional (Absalón-Medina y col., 2014). Sin embargo, la naturaleza dinámica y compleja de las condiciones *in vivo* hace que sea difícil duplicar *in vitro* tal microambiente mediante el uso de medios definidos. No obstante, existe la posibilidad de mejorar el sistema de cultivo entendiendo más las interacciones físico-químicas entre las gametas y embriones con el microambiente aprovechando la gran plasticidad que muestran al desarrollarse bajo las actuales limitadas condiciones ofrecidas. Las mejoras en los sistemas de cultivo deberán centrarse en el metabolismo embrionario en cada etapa de la producción *in vitro* de embriones dado que, en condiciones *in vivo*, el embrión es expuesto a un entorno dinámico y cambiante (Gardner, 1998, Gardner, 2008, Gardner y Lane, 2014a, Gardner y Harvey, 2015). El consumo de piruvato de sodio y otros ácidos carboxílicos es relativamente mayor en la etapa precompactación

coincidente con el ambiente relativamente más oxigenado del oviducto. Una vez en el útero, la tensión de oxígeno se reduce y aumenta el metabolismo de glucosa para acompañar una mayor demanda de energía por parte de la mórula compacta o blastocisto temprano. El cambio de bajo a alto consumo de glucosa se produce en la mayoría de las especies (Thompson y col., 2000, Thompson y Peterson, 2000, Summers y Biggers, 2003), el cual junto con el manejo correcto de otros nutrientes esenciales, factores de crecimiento, antioxidantes y amino ácidos que el embrión consume de manera selectiva (Combelles y Hennet, 2012, Hegde y Behr, 2012, Houghton, 2012, Meintjes, 2012, Zander-Fox y Lane, 2012) se traduciría en un menor número de dificultades a la hora de sobrepasar el "bloqueo de desarrollo" y se lograría una mayor producción de embriones de alta calidad que logren alta sobrevida pos-criopreservación y resultados satisfactorios luego de la transferencia (Bavister, 2000, Enright y col., 2000, Betteridge, 2006, Hansen, 2006, Vajta y col., 2010, Absalón-Medina y col., 2014).

1.4.1. Metabolismo embrionario

El estudio del metabolismo embrionario temprano en mamíferos comenzó hace varios años (Leese, 2012). Mientras que en el período de las décadas de 1940 y 1960 el trabajo se centró en el efecto de la adición de sustratos de energía a los embriones en cultivo, el mayor progreso en la comprensión del metabolismo embrionario se logró en la década de 1970 (Shepard y col., 1970, Biggers y Stern, 1973, Biggers y Borland, 1976). Durante esos años se experimentó con compuestos marcados radioactivamente y se examinaba el destino final de esos elementos añadidos al medio. Al igual que en otros aspectos del conocimiento en relación al desarrollo embrionario temprano en mamíferos, los primeros experimentos y datos provienen de especies laboratorio clásicas como el ratón, hámster y conejo. Luego siguieron los grandes animales domésticos, principalmente ovejas, cerdos, y vacas (Biggers, 1987). El mayor impulso en la investigación en el desarrollo embrionario temprano ocurrió en el humano con el objetivo de aplicar los conocimientos y avances en el tratamiento de la infertilidad (Steptoe y Edwards, 1978). En casi todas las especies estudiadas, el metabolismo del embrión en división es relativamente quiescente, desde cigoto hasta el estadio de mórula (Leese y col., 2008a). El consumo de oxígeno durante ese período es relativamente bajo, y el sustrato dominante que el consume del medio de cultivo es el piruvato (Rieger y Loskutoff, 1994). El piruvato se consume a una tasa casi constante. La fuente de piruvato proviene generalmente de la conversión glucolítica de la glucosa o tomada directamente del medio de cultivo. El piruvato también puede entrar en el ciclo de Krebs, donde puede ser oxidado completamente. A medida que el embrión

progresar en la división a blastocisto, hay un fuerte incremento en el consumo de glucosa con el consiguiente aumento en la liberación de lactato al medio de cultivo. Coincidente con esto hay una caída en el consumo de piruvato. Con la formación del blastocisto, el consumo de oxígeno también se incrementa (Thompson y col., 1996, Gardner, 1998, Gardner y col., 2000c, Harvey, 2007) apoyando la idea de que la producción de lactato por la vía glucolítica tiene un trascendencia menor en la generación de ATP para el blastocisto. Es mucho más probable que la glucólisis se eleva para satisfacer las necesidades de carbono para procesos de biosíntesis en lugar de ser fuente de energía dado que la glucólisis es un proceso relativamente ineficiente en la generación de ATP. La adición de aminoácidos al medio de cultivo ha tenido un efecto positivo sobre productividad del sistema PIVE como así también en la calidad de los embriones resultantes. La contribución de los aminoácidos a la producción del ATP no está claro, sin embargo, se lo ha relacionado con la tasa de producción de blastocistos (Rosenkrans y First, 1994, Lane y Gardner, 1997a) y con la viabilidad embrionaria (Houghton y col., 2002, Sturmey y col., 2010). Al considerar el metabolismo energético temprano de los embriones, es importante considerar la contribución de los triglicéridos endógenos (Ferguson y Leese, 1999). La β -oxidación de los ácidos grasos es imprescindible durante la maduración de los ovocitos, el desarrollo y en la etapa preimplantacional (Ferguson y Leese, 2006). Se ha identificado la importancia de la oxidación de ácidos grasos durante el desarrollo embrionario en diferentes especies. La carencia o ausencia de nutrientes esenciales no impide la continuidad de desarrollo de los embriones en varias especies (Kane, 1987, Thompson y col., 1992, Leese, 2012). Esto se puede explicar por el contenido de triglicéridos intracelulares que actuaría amortiguando la falta del sustrato faltante, transformándose en una fuente de energía alternativa (Ferguson y Leese, 2006, Sturmey y col., 2009, McKeegan y Sturmey, 2011, Dunning y col., 2014). Además de las características básicas del metabolismo energético durante el desarrollo temprano del embrión que refiere principalmente a la generación de ATP, la vía de las pentosas fosfato es una ruta metabólica necesaria para la biosíntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos en ovocitos y embriones (Javed y Wright, 1991, Sutton-McDowall y col., 2010).

Son varias las razones de porque resulta importante estudiar el metabolismo embrionario. Un objetivo radica en diseñar medios de cultivo específicos para cada especie que contengan los nutrientes apropiados y necesarios para producir descendencia viable y sana (Chronopoulou y Harper, 2015). Además, se estudia el metabolismo embrionario a los fines de encontrar un método no invasivo y en tiempo real para seleccionar los embriones con mayor potencial de generar preñeces (Botros y col., 2008, Aycliner y col., 2010, Uyar y Seli, 2014, Perkel y col.,

2015, Rødgaard y col., 2015). Por otra parte, con el advenimiento de la transferencia nuclear con células somáticas en ovejas (Wilmut y col., 1997, Wilmut y col., 2002), cabras (Baguisi y col., 1999), cerdos (Polejaeva y col., 2000) y bovinos (Cibelli y col., 1998) se requiere entender con mayor detalle la fisiología celular para su aplicación en la medicina regenerativa y en las nuevas técnicas destinadas a reemplazar las mitocondrias en ovocitos “viejos” en los programas de fertilización asistida (Hiendleder y Wolf, 2003, Spikings y col., 2006, Yabuuchi y col., 2012, Richardson y col., 2015). Estas herramientas requieren una comprensión detallada de la regulación metabólica del embrión preimplantacional para maximizar las chances de éxito, continuar avanzando en mejorarlas y descubrir nuevas.

Otra razón para continuar estudiando el metabolismo embrionario tiene lugar en la necesidad de identificar marcadores biológicos de la salud y viabilidad del embrión. Esto se basa en la variabilidad inherente en el metabolismo entre los diferentes embriones co-cultivados en una misma gota. La hipótesis del “embrión tranquilo” (Leese, 2002) propone que la supervivencia de los embriones preimplantacionales mejora cuando el metabolismo es bajo. Esta situación puede generarse reduciendo la concentración de nutrientes en el medio de cultivo y por tanto, como consecuencia del cultivo embrionario *in vitro* se produce el aumento de la actividad metabólica la cual compromete la capacidad de desarrollo. La reducción del metabolismo mediante bloqueantes químicos del metabolismo oxidativo o disminuyendo el nivel de oxígeno o la temperatura, mejora el desarrollo. Esta teoría, que propone que los embriones viables tienen una tasa metabólica disminuida, ha sido apoyada por varios estudios que muestran que los embriones con un metabolismo acelerado tanto de los hidratos de carbono como los aminoácidos presentan una viabilidad disminuida post-transferencia (Lane y Gardner, 1996, Donnay y col., 1999, Guerif y col., 2013). Sin embargo, otros estudios muestran que el metabolismo elevado de la glucosa consumo en un momento determinado del desarrollo embrionario estaría asociado a una mayor viabilidad del embrión (Gardner y col., 2011).

Las enfermedades metabólicas asociadas a animales de alta producción podría tener un correlato con el metabolismo embrionario el cual podría proporcionar información sobre los mecanismos que interfieren con la fertilidad y potencialmente identificar intervenciones terapéuticas (Boland y col., 2001, Pryce y col., 2004, Leroy y col., 2008a, Leroy y col., 2008b). Hay evidencia que los procesos metabólicos pueden influir directamente en la expresión génica (Van Hoesck y col., 2015). Aproximadamente el 30% de las crías derivadas de embriones PIVE tendrían un alto peso al nacer, las gestaciones tendrían una mayor duración, y existiría un sesgo

en la relación macho:hembra (mayor proporción de machos) (Thompson y Peterson, 2000, Gutierrez-Adan y col., 2001a, Camargo y col., 2010). Estas falencias del sistema PIVE podrían también tener un origen en desarreglos metabólicos (Biggers, 2004, Thompson, 2006, Absalón-Medina y col., 2014, Gardner y Harvey, 2015).

El método y protocolo de medición del metabolismo embrionario es crítico a la hora de extrapolar los descubrimientos al proceso *in vivo*. Los datos disponibles sobre el metabolismo embrionario se basan en la determinación por agotamiento o aparición del sustrato en estudio en el medio ambiente donde se desarrolla el embrión. Es necesario remarcar que en la mayoría de los estudios realizados, el sistema PIVE utilizado es estático en contraposición a lo que ocurre *in vivo* (dinámico). A esto se le suma la estrategia de cultivo elegida en relación al número de embriones por gota, tamaño de la gota y frecuencia de recambio del medio (Gardner y Harvey, 2015). Dada la heterogeneidad en el potencial de desarrollo embrionario, las mediciones individuales son clave. Se han utilizado sustratos marcados radioactivamente (Rieger, 1992), enzimas ligadas a compuestos fluorescentes aptas para detectar la aparición y desaparición de un sustrato (Guerif y col., 2013), proteómica y metabolómica para el análisis cualitativo y cuantitativo de proteínas y metabolitos, respectivamente, con la finalidad de obtener un perfil las proteínas y metabolitos existentes (Katz-Jaffe y col., 2005, Krisher y col., 2015), consumo de oxígeno para determinar el metabolismo oxidativo por nanorespirometría (Lopes y col., 2007), inhibidores metabólicos y cofactores enzimáticos con el fin de inhibir o favorecer ciertas vías metabólicas (Gardner y col., 2000b), entre otros. Debido a que el metabolismo es dinámico, un embrión puede responder rápidamente en respuesta a un cambio en el ambiente externo. Si bien estos análisis podrían ser un factor de estrés, los embriones son extremadamente plásticos y adaptables (Martinez Arias y col., 2013, Absalón-Medina y col., 2014).

Mientras que la industria de FIV humana ha evolucionado hacia los medios de cultivo definidos utilizando fuentes macromoleculares tales como la albúmina recombinante, el suero continúa siendo utilizado en muchos sistemas de producción animal. El cultivo con suero ha demostrado aumentar la tasa y cinética de desarrollo de blastocistos en bovinos (Thompson y col., 1998, Holm y col., 1999, Rizos y col., 2003, Leivas y col., 2011). Sin embargo, su presencia también se ha asociado con un aumento intracelular de lípidos (Ferguson y Leese, 2006), la alteración del metabolismo (Reis y col., 2003), aumento del estrés oxidativo (Cagnone y Sirard) y la reducción de la supervivencia post vitrificación (Rizos y col., 2001, Gomez y col., 2008).

Además de que el embrión se adapta a su medio ambiente, el medio de cultivo también cambia por su interacción con las condiciones externas (nivel de CO₂, temperatura) y con los embriones. El agotamiento de sustratos y la acumulación de sustancias liberadas por el embrión como lactato y aminoácidos cambian el medio ambiente que rodea al embrión. La acumulación de amonio proveniente de la glutamina (Gardner y Lane, 1993) y del lactato interferiría con el sistema buffer/pH del medio y podría producir el agotamiento de los sustratos necesarios para la generación de ATP (de Souza y col., 2015).

La producción de lactato en altas cantidades por parte del blastocisto serviría para facilitar varias funciones clave durante la implantación (Gardner, 2015). Estas incluyen la biosíntesis y preparación del tejido endometrial, promover la formación de nuevos vasos sanguíneos y la inducción de la modulación local del sistema inmune en el ambiente uterino (Gardner y Harvey, 2015). La disponibilidad de nutrientes, la concentración de oxígeno y el estado reducción-oxidación del blastocisto regulan la actividad de las vías metabólicas específicas (Harvey y col., 2002). La pérdida del equilibrio metabólico está asociado a una reducción en el potencial de implantación y desarrollo fetal subsiguiente (Gardner y col., 2000c). Incluso un estrés metabólico transitorio en el estadio de blastocisto puede afectar el desarrollo fetal y el peso al nacer (Fleming y col., 2004, Takahashi, 2012).

Una relación entre el metabolismo del blastocisto y la posterior viabilidad después de la transferencia se informó por primera vez en 1980 (Renard y col., 1980) donde se mostró una correlación positiva entre el consumo de glucosa por el blastocisto y el establecimiento de la preñez. El análisis de la conexión entre la actividad metabólica y la viabilidad reveló que tanto la tasa de consumo de nutrientes y su destino metabólico estaban relacionadas con la viabilidad (Lane y Gardner, 1996, Donnay y col., 1999). La capacidad de los blastocistos de producir una cantidad constante de lactato durante la implantación tiene una importancia fisiológica. Los embriones que son capaces de mantener niveles adecuados de actividad a través de las vías metabólicas específicas tienen una mayor viabilidad (Gardner y col., 2011, Lee y col., 2015). Un estudio reciente demostró que los embriones pronucleados que dividen más rápido produjeron blastocistos más viables, y que tales blastocistos tienen un consumo de glucosa más alto y una tasa glucolítica más baja que los blastocistos desarrollados a partir de cigotos con tasa de división lenta (Lee y col., 2015). El análisis de la utilización de aminoácidos en embriones señala que, en general, aquellos embriones que llegaron al estadio de blastocisto exhibieron un menor recambio de aminoácidos en comparación con los embriones "no viables", lo cual refuerza la hipótesis de

que un "metabolismo tranquilo" es consistente o se correlaciona positivamente con la viabilidad embrionaria (Leese, 2002, Baumann y col., 2007, Leese y col., 2007, Leese y col., 2008a). Esta hipótesis plantea que los embriones con alta viabilidad tienen una baja actividad metabólica lo cual refleja una fisiología menos estresada, menor consumo de nutrientes y bajo recambio de aminoácidos (Leese y col., 2008a). Sin embargo, otros estudios no apoyan esta hipótesis (Lane y Gardner, 1996, Gardner y col., 2011). Estos trabajos manifiestan que la viabilidad embrionaria estaría asociada a un aumento de la tasa metabólica. De hecho, el consumo de oxígeno por embriones en desarrollo indica que la viabilidad estaría asociada con el aumento en la tasa de consumo de oxígeno (Lopes y col., 2010a, Lopes, 2012). Estas teorías aparentemente antagónicas tendrían tendrían como principal diferencia en que los estudios sobre lo cual se construyó la hipótesis de "metabolismo tranquilo" tiene como factor común el uso de 20% de oxígeno durante el cultivo y análisis metabólico de los embriones. Este alto nivel de oxígeno ejerce efectos negativos en la expresión genética, proteómica y metabolismo del embrión (Ajduk y Zernicka-Goetz, 2012, Montag y col., 2013, Sakkas, 2014, Gardner y Harvey, 2015).

En resumen, el blastocisto exhibe un metabolismo caracterizado por altos niveles de glicolisis aerobia. La demanda de energía por parte del blastocisto no sólo proviene a medida que aumenta el número de células, sino también con el aumento concomitante de la biosíntesis producto de la mayor cantidad de células, la formación y mantenimiento del blastocelo. La glucosa consumida por el blastocisto se requiere también para la producción de intermediarios biosintéticos y reductores equivalentes. Además, la glucosa estaría vinculada en la proporción o relación de macho:hembra. El sistema "lanzadera malato-aspartato" juega un papel clave en la regulación del metabolismo de la glucosa en el blastocisto. El lactato producido por el blastocisto podría facilitar el proceso de implantación a través de su capacidad para aumentar la angiogénesis y regular/modular la función inmune local. Aunque el embrión puede adaptarse a los cambios ambientales y a diferentes concentraciones de nutrientes (plasticidad embrionaria), la adaptación y/o tolerancia a esa situación tiene un costo en términos de capacidad de desarrollo. El estrés producto de las condiciones de cultivo (temperatura, CO₂, O₂) y/o amonio, puede impactar negativamente en el metabolismo del blastocisto y comprometer su viabilidad. Existe evidencia clara de que el metabolismo es un indicador de la salud del embrión. Sin embargo, resta elucidar con mayor detalle cómo se ve afectado el metabolismo por las perturbaciones (condiciones de cultivo, ingredientes del medio de cultivo, pH, osmolaridad, apertura de la incubadora, luz, etc.), los mecanismos reparadores y cómo funcionan. La regulación de las vías metabólicas durante el desarrollo temprano puede ser crítico para la salud

del embrión a largo plazo. Las demandas de energía para la síntesis proteica, división celular y formación de blastocistos requieren de una adecuada regulación de las vías nutriente-sensibles, mientras que la desregulación puede contribuir a la desaceleración del desarrollo, pérdida de viabilidad, y/o muerte embrionaria temprana (Shepard y col., 1970, Biggers y Stern, 1973, Biggers, 1987, Bavister, 1995, Leese, 1995, Thompson, 1996, Krisher y Bavister, 1998a, Khurana y Niemann, 2000b, Lane, 2001, Watson y Barcroft, 2001, Gopichandran y Leese, 2003, Sinclair y col., 2003, Bączkowski y col., 2004, Fleming y col., 2004, Sutton-McDowall y col., 2010, Leese, 2012, Baltz, 2013, Martínez Arias y col., 2013, Montag y col., 2013, Downs, 2015, Gardner y Harvey, 2015, Leese, 2015).

1.5. Deficiencias del sistema PIVE

Las deficiencias encontradas en el sistema de producción *in vitro* de embriones, se deberían a factores multicausales. La capacidad del ovocito maduro de sobrepasar las etapas tempranas (fertilización, desarrollo preimplantacional y la implantación) se denomina competencia y es una medida de su calidad (Leibfried-Rutledge, 1999, Gandolfi y Gandolfi, 2001, Lonergan y col., 2001, Merton y col., 2003, Hussein y col., 2006). El ovocito adquiere la competencia de manera gradual y secuencial durante la foliculogénesis a medida que éste crece y las células que lo rodean se diferencian (Eppig, 1996). Muchos factores durante el desarrollo folicular afectan la competencia de los ovocitos, por ejemplo, (1) el estado fisiológico y reproductivo de la hembra donante, el origen de los ovocitos, donde los ovocitos derivados de folículos grandes son más competentes que los que provienen de folículos pequeños (Lonergan y col., 1994b, Leibfried-Rutledge, 1999, Fair, 2003, Machatkova y col., 2004), (2) la salud del folículo, donde la dominancia folicular y la atresia están asociados con la competencia (Blondin y Sirard, 1995, Hagemann, 1999, Mermillod y col., 1999, de Wit y col., 2000, Hendriksen y col., 2000), (3) la estimulación hormonal a los folículos en desarrollo claramente mejora la competencia de los ovocitos (Blondin y col., 2002, Sirard y col., 2006, Chaubal y col., 2007, De Roover y col., 2008, Nivet y col., 2012, Dias y col., 2014) y (4) la comunicación y grado de interacción dentro del ovocito y las células del cumulus que lo rodean son necesarias para el desarrollo de un ovocito competente (Krisher, 2004, Hussein y col., 2006, Gilchrist y col., 2008, Sirard, 2011, Paulini y col., 2014). En consecuencia, el ovocito madurado *in vitro* posee una menor competencia debido en parte a un inadecuado sistema y ambiente *in vitro* que soporte o promueva la maduración completa del ovocito (Greve y col., 1987, Leibfried-Rutledge y col., 1987, Rizos y col., 2002c, Sutton y col., 2003, Krisher, 2004).

El origen de los ovocitos como factor determinante en la adquisición de la competencia. Los ovocitos destinados a la producción *in vitro* de embriones bovinos se pueden coleccionar a partir de ovarios de matadero, como así también de hembras donantes vivas (**Figura 14**). Los ovocitos aspirados de ovarios de matadero provienen de una población altamente heterogénea de folículos que se encuentran en distintas etapas o fases de la dinámica folicular, sumado al desconocimiento del estado fisiológico y categoría de la hembra faenada y sus antecedentes reproductivos y sanitarios (Merton y col., 2003). Entre las principales desventajas de recuperar ovocitos de ovarios de matadero es la falta de repetitividad. Una vez que la hembra ha sido faenada no puede haber más colecta de ovocitos de la misma donante. Como contraparte a esta situación, las ventajas radican en su alta disponibilidad y bajo costo operativo. Los ovocitos colectados por OPU provienen de folículos que no fueron expuestos a los efectos de la dominancia y no han sido objeto del desarrollo pre-ovulatorio final (Fortune y col., 2001, Lucy, 2007a, Aerts y Bols, 2010b).

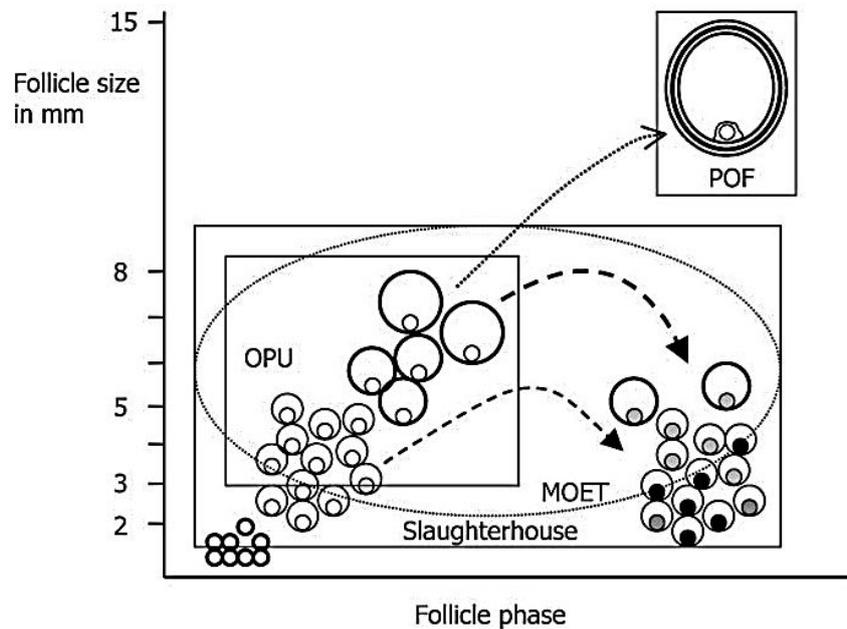


Figura 14: Origen de los ovocitos en los diferentes sistemas de producción de embriones. Ovum pick-up (OPU = área del rectángulo pequeño); PIVE con ovocitos de matadero (Slaughterhouse= área del rectángulo grande); superovulación y colecta de embriones convencional (MOET = área en el óvalo); folículo pre-ovulatorio (POF). Los folículos con ovocitos en color blanco no son atrésicos; mientras que los de color gris muestran atrésia temprana y los de color negro son atrésicos (Merton y col., 2003)

La calidad de los ovocitos se define a menudo como su competencia o capacidad para producir un embrión viable/transferible como resultado del sistema de producción *in vitro*. Esta definición establece que la competencia de desarrollo no sólo depende de la calidad intrínseca del ovocito, si no también está relacionado con los procedimientos de PIVE, tipo de semen utilizado para fertilizar, método de recolección de los ovocitos (matadero versus OPU), entre otros (Pavlok y col., 1992, Hirao, 2011, Paulini y col., 2014). Otra definición de competencia, que iría más allá del embrión viable, remarca la capacidad del ovocito para reanudar la meiosis, la capacidad para iniciar el proceso de división después de la fertilización, la capacidad para desarrollarse hasta la etapa de blastocisto, la capacidad de establecer la preñez y que llegue a término y la capacidad de producir una cría con buena salud (Sirard y col., 2006, Watson, 2007). Esta capacidad o competencia de desarrollo es adquirida por el ovocito a través de la biosíntesis y/o el almacenamiento de varias moléculas clave. Estas moléculas son el resultado de procesos que ocurren en el núcleo y en el citoplasma durante el crecimiento y la maduración del ovocito. El almacenamiento de una reserva adecuada de estas moléculas se conoce como maduración molecular (Sirard y col., 2006). La maduración molecular es el proceso por el cual un suministro adecuado (en un tiempo, espacio y dosis adecuada) de los factores requeridos son adquiridos para lograr un ovocito competente. El ovocito está en casi constante cambio desde la etapa de folículo primordial hasta la ovulación (Picton, 2001). Parecería que hasta incluso después de que el ovocito ha alcanzado su tamaño final, la transformación continúa (Hytel y col., 1997). Los cambios finales se producirían cuando el ovocito disminuye progresivamente sus actividad transcripcional (Fair, 2003) y por lo tanto, alcanza el nivel de competencia óptimo cuando tiene todo el ARN requerido para afrontar los distintos eventos durante el período de desarrollo (Gordon, 2003f, Ferreira y col., 2009). El ambiente folicular tendría un claro impacto en la capacidad del ovocito para desarrollarse más allá de la fertilización. Los principales parámetros foliculares que se evalúan normalmente son el tamaño, el grado de atresia, los efectos de la superestimulación y el nivel de diferenciación (Hytel y col., 1997, Blondin y col., 2002, Vegetti y Alagna, 2006, Chaubal y col., 2007, Sirard y col., 2007, Watson, 2007, Hirao, 2011, Nivet y col., 2012).

Ciertamente que la tasa de producción de embriones viables o transferibles al día siete de cultivo dista mucho de lo aceptable. El **Figura 15** muestra la productividad de cada etapa del proceso PIVE. La maduración nuclear que se caracteriza por la capacidad del ovocito para reanudar la división meiótica hasta metafase II parecería tener una alta eficiencia. La gran mayoría de los ovocitos madurados *in vitro* provienen de folículos antrales. La maduración nuclear puede

visualizarse por la extrusión del segundo cuerpo polar y la aparición de la segunda placa de la metafase. El desempeño del resto de los procesos o etapas PIVE sería significativamente menor. La mayor pérdida en la productividad del sistema PIVE estaría durante el período de cultivo luego de producirse el clivaje. Algunos investigadores ponen mayor énfasis en una deficiente o incompleta maduración citoplasma la cual incluye una sucesión de transformaciones en las mitocondrias, gránulos corticales y retículo endoplasmático liso y rugoso; todas ellas necesarias para el progreso de la maduración y el bloqueo de polispermia (Hytel y col., 1997, Gilchrist y Thompson, 2007, Ferreira y col., 2009). En la misma línea, la presencia de proteínas del citoesqueleto y la distribución las organelas son factores importantes en la maduración de los ovocitos y que pueden afectar su competencia de los ovocitos (Kim y col., 2000, Sun y Schatten, 2006).

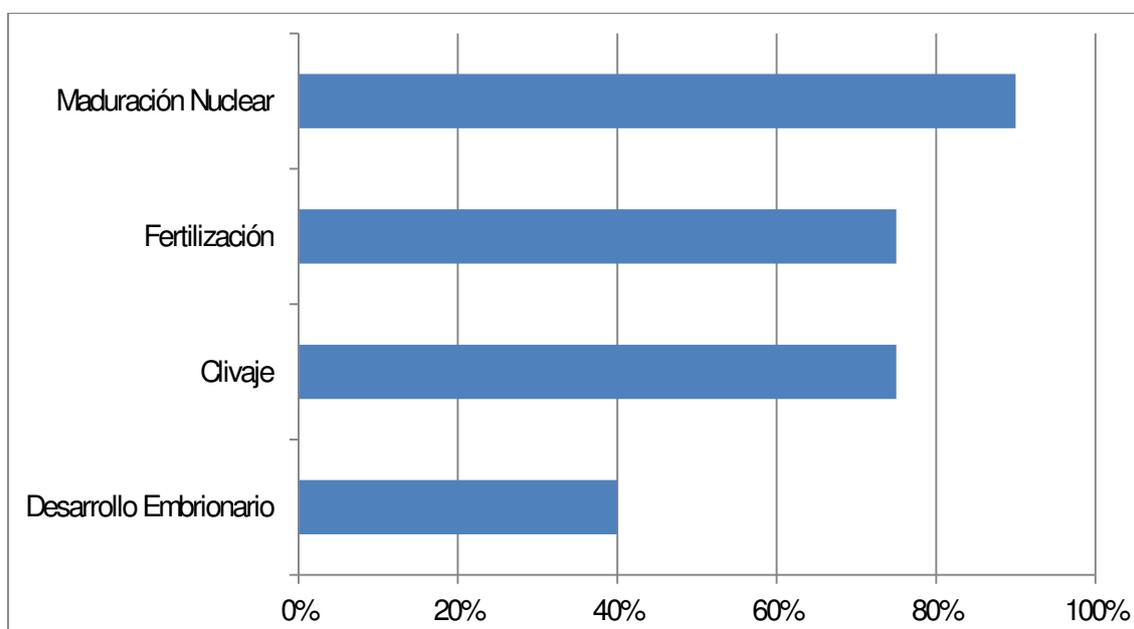
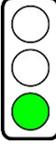
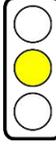
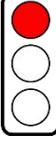
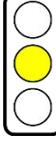
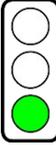
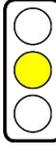
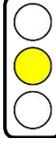
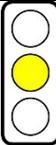
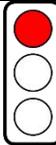
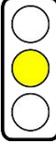
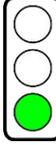
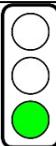
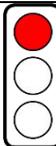
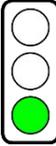
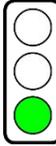


Figura 15: Porcentaje de éxito en cada etapa de PIVE (Lonergan y col., 2001, Sirard y col., 2006, Lonergan y Fair, 2008, Lonergan y Fair, 2014)

Otras evidencias parecerían indicar que el cultivo de los presuntos cigotos y embriones presenta diversas falencias y que éstas afectan el normal desarrollo de los embriones tanto en la calidad, criotolerancia y expresión génica (Niemann y Wrenzycki, 2000, Rizos y col., 2002c, Lonergan y col., 2003, Badr y col., 2007). La Tabla 9 muestra las diferentes respuestas a los posibles escenarios (*in vivo* o *in vitro*) de maduración, fertilización y cultivo y su efecto sobre la tasa de producción de embriones. En principio, la proporción de ovocitos que llega al estadio de blastocisto no estaría afectado por el sistema de cultivo, sino más bien por el origen de los

ovocitos (Rizos y col., 2002c, Rizos y col., 2008). En particular, el cultivo de cigotos en el oviducto de una oveja (simulando una situación *in vivo*) no incrementaría la tasa de desarrollo embrionaria. No obstante, el medio ambiente del oviducto pareció haber mejorado la calidad de los embriones, medida por la supervivencia de los embriones post-descongelación (Holm y col., 1994, Tervit y col., 1994, Galli y Lazzari, 1996, Enright y col., 2000, Pugh y col., 2001, Rizos y col., 2002c, Galli y col., 2004, Rizos y col., 2008).

Tabla 9: Consecuencias de la maduración, fertilización de ovocitos bovinos y el desarrollo temprano del embrión *in vitro* versus *in vivo*. Implicancias en la producción y calidad de los blastocistos (Fizos y col., 2002c)

Experimento	Maduración	Fertilización	Cultivo	Producción de Embriones	Sobrevida Post-Descongelado
1	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>		
	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>		
2	<i>In vivo</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>		
	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>		
3	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>		
	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>		
4	<i>In vivo</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>		
	<i>In vivo</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vivo</i>		



Significativamente menor



No hubo diferencia



Significativamente mayor

Del mismo modo, los resultados de la Tabla 9 (Experimento 4) demuestran que el cultivo *in vitro* de cigotos derivados de ovocitos de alto potencial de desarrollo (madurados y fertilizados *in vivo*) produce blastocistos de baja criotolerancia, similar a los resultantes de maduración, fertilización y cultivo *in vitro*. Las diferencias encontradas entre embriones cultivados *in vitro* versus *in vivo* estarían a nivel ultraestructural puesto que a nivel morfológico no se han encontrado mayores diferencias entre ambos sistemas de cultivo. Estas diferencias estarían asociadas a un mayor espacio perivitelino, vacuolas en las células trofoblásticas, una población escasa de las microvellosidades, una muy reducida red de conexiones intercelulares, mitocondrias con menor densidad y un gran aumento en el contenido de lípidos (Abe y col., 1999b, Crosier y col., 2000, Crosier y col., 2001, Fair y col., 2001b). Las diferencias en la expresión de genes entre embriones cultivados *in vitro* e *in vivo* podrían explicar las diferencias de calidad observadas (Wrenzycki y col., 1996, Lonergan y col., 2003, Wrenzycki y col., 2004, Badr y col., 2007). Otro factor a considerar sería el agregado de suero al medio cultivo *in vitro* el cual aceleraría el proceso de desarrollo y de esta forma, podría afectar la regulación y transcripción de ciertos genes asociados a la calidad del embrión, su resistencia a la criopreservación y normal crecimiento y desarrollo fetal (Bavister, 1995, Carolan y col., 1995, Farin y Farin, 1995, Thompson y col., 1998, Young y col., 1998, Lonergan y col., 1999b, Farin y col., 2001). Los componentes del medio de cultivo, la elección del protocolo de cultivo y la plataforma utilizada pueden tener también un efecto significativo sobre el metabolismo del embrión, lo cual puede tener implicancias directas sobre la tasa de formación de blastocistos viables, la calidad, congelabilidad y sobrevivencia pos-descongelado como así también en la tasa de implantación, preñez y nacimientos de terneros/as normales (Leibo y Loskutoff, 1993, Gardner, 1994, Krisher y col., 1999, Bavister, 2000, Khurana y Niemann, 2000b, Massip, 2001, Massip y Leibo, 2002, Vajta y Kuwayama, 2006, Vajta y Nagy, 2006, Saragusty y Arav, 2011, Arav, 2014, Gardner y Lane, 2014b).

El primer cultivo embrionario *in vitro* exitoso en mamíferos se publicó a mediados del siglo pasado (Whitten, 1956). Desde entonces, la comunidad científica se pregunta por qué la capacidad de desarrollo durante el período de cultivo es baja en comparación con la IVM y FIV, y desde hace bastante tiempo, estancada en 30%-40%. Parecería haber un consenso generalizado en definir al entorno *in vitro* como "inadecuado", "estresante" y "evidentemente inferior" en comparación con su contraparte *in vivo*. El foco actual estaría limitado a reducir la brecha entre estos dos sistemas, aunque otras posturas sostienen que el cultivo *in vitro* de embriones no debe ser considerado como una copia imperfecta de los procedimientos *in vivo*,

sino como un proceso artificial con sus propios marcos, limitaciones y posibilidades (Vajta y col., 2010). A los fines de poder dilucidar la génesis del bajo desempeño de desarrollo embrionario se identificaron algunos factores controversiales. El primero se originaría en que la gran mayoría de los procedimientos de cultivo *in vitro* de embriones provienen del cultivo de células somáticas. Los procedimientos, protocolos, herramientas y equipos del cultivo celular se establecieron antes del cultivo *in vitro* embrionario y se convirtieron en el modelo de producción. Las innovaciones subsiguientes en el campo de las células somáticas tuvieron poco o ningún efecto sobre el cultivo de embriones *in vitro*. La razón de esto sería la morfología, función y regulación de las células somáticas son diferentes de las de los embriones de mamíferos. Estas diferencias y sus consecuencias se resumen en los siguientes puntos: i) Los embriones pre-implantacionales no forman parte del cuerpo materno y se desarrollan de manera independiente en el oviducto/útero; ii) mientras que las células somáticas de los mamíferos están rodeadas por el fluido extracelular rico en nutrientes, proteínas y otros factores, los embriones pre-implantacionales están rodeados por una cantidad aún no definida (pero probablemente muy baja) de líquido oviductal y uterino diluido, que contiene menos recursos y sus características físico-químicas muestran cambios espaciales y temporales (Leese y col., 2001, Hunter, 2005), iii) en contraste con las células somáticas que no pueden proliferar sin estímulos tróficos externos, los cigotos de mamíferos están intrínsecamente programados para desarrollarse hasta la fase de blastocisto sin ningún estímulo externo. Sin embargo, los embriones *in vivo* están expuestos y ciertamente responden a una serie de factores interrelacionados endocrinos, paracrinicos y autocrinos (O'Neill, 2008), iv) el líquido oviductal y uterino afecta positivamente el desarrollo del embrión pre-implantacional (Leese y col., 2008a). El rol de estos factores sobre el embrión no podría ser imitado por una simple monocapa de células epiteliales del oviducto bajo un sistema de co-cultivo; v) el ambiente oviductal-uterino no es necesariamente favorable para el desarrollo del embrión. Dependiendo del estado del tracto reproductivo y/o físico/fisiológico materno (estatus nutricional, lactancia, sanitario), puede ser perjudicial y causar efectos negativos en el desarrollo del feto (Leese, 2002, Leese y col., 2008b) ; vi) el establecimiento y mantenimiento del microambiente alrededor del embrión desempeña un papel fundamental en el desarrollo embrionario (Hunter, 2005, O'Neill, 2008). Los factores autocrinos parecen ser constituyentes decisivos de este microambiente y con los métodos de cultivo actuales (establecidos originalmente para las células somáticas), este microambiente no se puede establecer y mantener adecuadamente *in vitro*.

Otro factor de discusión está relacionado con la interpretación del ambiente *in vivo* y la aplicación de esas características de manera directa al sistema de cultivo *in vitro*. Algunos ejemplos son i)

la existencia de algunos factores oviductales o fenómenos que ocurrirían en el oviducto comúnmente citados no han sido confirmados en mamíferos preñados (Vajta y col., 2010); ii) algunos sustratos presentes en el fluido oviductal *in vivo* (potasio por ejemplo) pueden ser perjudiciales *in vitro* (Biggers, 2002, Biggers, 2004), mientras que otros que no están presentes en el oviducto, pueden resultar positivos; iii) algunas características como los lípidos intracitoplasmáticos pueden ser contraproducentes en el sistema *in vitro*; iv) la selección del ratón como “modelo de referencia” animal puede no ser la elección óptima y llevar a inferencias erróneas para otras especies animales; v) el hábito de minimizar de cualquier tipo de estrés para el embrión es casi mandatorio en el laboratorio de fertilización *in vitro*. Sin embargo, parecería que un cambio o shock limitado podría inducir procesos metabólicos que eventualmente mejoren la calidad del embrión e inclusive su criotolerancia (Siqueira Filho y col., 2011).

Los medios para el cultivo de embriones saben contener agua pura, sales, bicarbonato de sodio, un quelante, piruvato, lactato, aminoácidos, macromoléculas y antibióticos. Esta formulación se mantiene sin grandes cambios desde hace mucho tiempo. No obstante, existen marcadas diferencias o desacuerdos en casi todos los componentes de los principales medios de cultivo en bovinos y humanos (Gardner y Lane, 2014b). Inicialmente, el desarrollo de los medios de cultivo se basó en dos conceptos utilizando medios simples como punto de partida. El primer enfoque fue “dejar que los embriones elijan” (Biggers, 2002). El otro camino elegido fue “volver o copiar a la naturaleza” con la idea de recrear medios similares al fluido oviductal en el humano (Quinn y col., 1985, Leese, 1998) y bovino (Tervit y col., 1972a). Hasta el momento, ninguna de estas estrategias ha sido lo suficientemente exitosa para el desarrollo de medios de cultivo que garantice altas tasas de producción, calidad embrionaria, implantación, preñez y nacimientos (Quinn, 2000). La visión de “que el embrión decida” presenta la dificultad o interrogante de qué ofrecerle al embrión y en qué cantidad resultando dificultosa la interpretación de los resultados (Summers y Biggers, 2003). El principal problema del principio de “volver a la naturaleza” es la cantidad extremadamente baja del fluido en el oviducto y útero y los problemas técnicos (y éticos) relacionados a su recolección y apropiada medición y caracterización. Una tercera corriente se focalizó en utilizar datos de consumo de nutrientes por parte del embrión, y de esa forma, elaborar el medio de cultivo adecuado (Leese, 2003, Gardner, 2008). La elección del medio de cultivo tiene un impacto determinante en el resultado final ya que durante la primera semana de desarrollo embrionario ocurren eventos trascendentales como la primera división o clivaje, la transición entre el control genómico materno al embrión, superación del bloqueo, activación del genoma, compactación de la mórula, diferenciación y distribución celular (MCI y

CT), blastulación y eclosión (Thompson y Peterson, 2000). La adaptación a un ambiente inadecuado puede causar cambios en la epigenética, la transcripción, el metabolismo y la distribución de células embrionarias. Los componentes de los medios de cultivo pueden producir alteraciones en el patrón de expresión génica de los embriones pre-implantacionales y causar un aumento del peso al nacer e incidencia de abortos, muertes neonatales y malformaciones posnatales (Thompson y col., 2007, Duranthon y col., 2008).

Para la mayoría de los embriones de las especies de mamíferos, el cultivo en grupo presenta ventajas productivas tanto en especies monotocas como politocas (Vajta y col., 2000, O'Neill, 2008). El sistema de cultivo bovino *in vitro* con ovarios de matadero puede incubar hasta 50 embriones juntos en el centro de una gota de 400 μ l de medio. La tasa de blastocistos que se logra alcanzar de manera consistente llega al 50% respecto de ovocitos inmaduros en comparación con el 34-39% cuando se realiza el cultivo individual. Este tipo de sistema parecería resolver o minimizar los supuestos efectos negativos de los embriones muertos, degenerados y/o en vías de degradación (Hagemann y col., 1998, Holm y col., 1999, Vajta y col., 2008). La principal ventaja del sistema de cultivo grupal sería el máximo aprovechamiento por parte del embrión de los factores de crecimiento auto/paracrinos (Paria y Dey, 1990b, Ferry y col., 1994, Gopichandran y Leese, 2006). El efecto del cultivo grupal puede también producirse o incrementarse si se disminuye el volumen de medio por embrión (aumentando la densidad) (Reed, 2012). La relación embrión:volumen no estaría determinada claramente mostrando diferencias sustanciales entre artículos publicados. Desde 1:1 (embrión: μ l volumen de medio) (Ferry y col., 1994), 1:10 (Holm y col., 1999) y hasta 1:30 (Hoelker y col., 2010). Cabe destacar que la estrategia de reducir el volumen de medio para aumentar la densidad puede reducir la tasa de compactación, cavitación, eclosión, la distribución de MCI y TC, el número de blastómeros y la tasa de implantación (Wiley y col., 1986, Lane y Gardner, 1992, Stoddart y col., 1996). En contraste, el cultivo en grupo aumenta la formación de blastocistos, el número de células embrionarias totales y la producción de interferón-tau (O'Doherty y col., 1997, Larson y Kubisch, 1999, Khurana y Niemann, 2000a). Placas de cultivo recientemente introducidas al mercado permiten el cultivo reducido (incluso individual) de embriones con la posibilidad beneficiarse del cultivo en grupo mediante canales entre gotas que permitirían que factores embriotróficos circulen por la gota compartimentalizada (Ebner y col., 2010, Swain y Smith, 2011, Smith y col., 2012).

El co-cultivo tiene un gran número adeptos o seguidores en los laboratorio de FIV humanos (Mercader y col., 2006, Parikh y col., 2006, Dominguez y col., 2010), especialmente en pacientes con ciclos de FIV recurrentes y que no logran embriones viables y/o gestaciones (Urman y Balaban, 2005). Un meta-análisis de varios ensayos demostró que el co-cultivo aumenta el número de blastómeros, la tasa de implantación y embarazo (Kattal y col., 2008). El hecho de que el co-cultivo pueda derivar de no solo células del tracto reproductivo sino también de células somáticas, células madre, entre otras, indicaría que los factores que liberan éstas células y que contribuyen a incrementar la producción y calidad de los embriones, no son específicos del tracto reproductivo. Su acción sería la disminución de la concentración de oxígeno en la cercanía al embrión o la eliminación de factores tóxicos (Bavister, 1992, Bavister, 1995, Donnay y col., 1997). En el bovino, la disminución de la concentración de oxígeno del 20% al 5% redujo drásticamente la necesidad del co-cultivo (Voelkel y Hu, 1992, Nagao y col., 1994, Trounson y col., 1994) y para neutralizar o minimizar la acción de factores tóxicos, se simplificaron los medios de cultivo evitando sustancias químicas innecesarias potencialmente tóxicas (Thompson y col., 2007). Junto con el suero, el co-cultivo ha sido señalado como causante de algunas anomalías durante la gestación y aumento de peso al nacer (van Wagtendonk-de Leeuw y col., 1998, Khosla y col., 2001).

En animales domésticos, tres laboratorios independientes (Voelkel y Hu, 1992, Nagao y col., 1994, Trounson y col., 1994) demostraron que el cultivo de embriones en un sistema de co-cultivo con células somáticas requiere concentraciones atmosféricas de oxígeno, mientras que el cultivo de embriones sin células soporte se desarrollaban mejor en oxígeno reducido. Las explicaciones de este fenómeno permanecen hasta hoy inconclusas debido a la aparición de medios simples y la utilización de bajo oxígeno. El problema del co-cultivo fue perdiendo interés mientras que, el uso de medios simples con suplementación y con una concentración de oxígeno del 5% ó 6% fue ganando terreno. Una disminución adicional de la concentración de oxígeno durante el cultivo *in vitro* puede tener consecuencias negativas. La concentración de oxígeno al 2%, aunque puede conducir a un aumento en las tasas de blastocistos, puede causar anomalías en el desarrollo embrionario y fetal (Thompson y Peterson, 2000). Tanto los sistemas de provisión de gases con inyección de gases mediante sensores infrarrojos (incubadora convencional), los sistemas de alimentación continuos con mezcla de gases pre-determinadas y los sistemas cerrados (bolsa o cámara de cultivo) llenados con gas mezcla son opciones válidas para el cultivo embrionario desde cigoto hasta la eclosión (Vajta y col., 1997).

Los medios de cultivo divididos en “simples” o “complejos” según la cantidad de sus componentes y “definido”, “semi-definido” y “no-definido”, de acuerdo a la suplementación utilizada, no han satisfecho hasta el momento todas las necesidades del embrión ni tampoco mantenido su viabilidad y criotolerancia (Chronopoulou y Harper, 2015). Los medios simples como el CR1 (Rosenkrans y First, 1994), SOF (Tervit y col., 1972a), KSOM (Biggers y col., 1997); hasta medios más complejos como el TCM-199 (Summers y Biggers, 2003) han resultado ser parcialmente efectivos en superar la barrera del 40% de desarrollo, la cual parecería ser el techo actual (Lonergan y Fair, 2014). La principal diferencia entre medios definidos frente a los semi-definidos y no-definidos es el conocimiento de la concentración y composición de cada componente del medio. El suplemento más popular en los medios definidos es PVA (Thompson, 2000, Gardner, 2008), sin embargo la productividad de esta macromolécula frente a la BSA y FCS es marcadamente inferior (Holm y col., 1999). Los medios semi-definidos cuentan generalmente con la suplementación de BSA y FCS en los medios no-definidos (Gardner, 1998, Gardner y Lane, 1998). El uso de suero fetal está muy extendido en la formulación de medios no-definidos como una importante fuente proteica para el embrión; sin embargo, varios estudios han demostrado un efecto bifásico. Por un lado inhibe la división temprana del cigoto, y por otro lado, aumenta la velocidad del desarrollo y la aparición temprana de blastocistos (Pinyopummintr y Bavister, 1991, Bavister y col., 1992, Thompson y col., 1998, Gutierrez-Adan y col., 2001b, Rizos y col., 2003). Pero el suero afecta a la morfología y la bioquímica del embrión (Fair y col., 2001b), provoca una acumulación anormal de gotas lipídicas intracitoplasmáticas (Rizos y col., 2002a), se lo ha relacionado con una alteración que se caracteriza por la ocurrencia de fetos de gran tamaño/peso y una elevada mortalidad de los mismos (Young y col., 1998), y también con una reducción en la tasa de supervivencia post-congelado (Rizos y col., 2003). La BSA utilizada en la formulación de medios semi-definidos puede aumentar la tasa de desarrollo embrionario y el número total de células del embrión (Sung y col., 2004) pero en altas concentraciones en el medio de cultivo provoca un descenso en la tasa de supervivencia post-congelado (Rizos y col., 2003). La albúmina actuaría como portador de vitaminas, hormonas, lípidos y factores autocrinos y podría neutralizar algunas toxinas que se producen en los medios de cultivo (Gardner, 2008, O'Neill, 2008). Sin embargo, ni la BSA ni los nuevos sustitutos sintéticos han mostrado resultados significativamente superiores respecto al FCS (Holm y col., 1999, Gandhi y col., 2000, Duque y col., 2003). En los comienzos del cultivo *in vitro* de embriones, el suero era un componente común de los medios. Su presencia fue especialmente necesaria en los sistemas con co-cultivo, ya que las células somáticas lo necesitan para su crecimiento. Sin embargo, desde finales de los '90, ha crecido la resistencia en su utilización especialmente durante el

cultivo ni siquiera es tolerado durante períodos cortos (ej. después del día 3-4 de cultivo). Las razones ya han sido comentadas en párrafos anteriores. No obstante cabe mencionar, que el peso al nacer puede estar influenciado por la especie, raza, sexo, entre muchos otros factores. La oveja y el ratón parecerían ser más propensos a padecer alteraciones morfológicas embrionarias, anomalías fetales durante la gestación, neonatal y posnatal, cuando se utiliza 20% de suero en el medio de cultivo (Thompson y col., 1995, Khosla y col., 2001). Si bien el alto nivel de suero podría causar anomalías que originen un aumento del peso al nacer, otras alteraciones o interrupciones durante el periodo de cultivo (inclusive antes) podrían también desencadenar este problema de sobrepeso al nacer (Lawrence y Moley, 2008). También se han encontrado dificultades de alto peso al nacer en ovejas luego del cultivo *in vitro* sin suero, en presencia de PVA o BSA (Rooke y col., 2007, Sinclair, 2008). La literatura publicada demostraría que la evidencia más directa sobre el efecto negativo del suero proviene mayoritariamente de ovejas o ratones, las cuales tengan cierta predisposición al síndrome LOS, o de un número muy limitado de estudios realizados en otras especies. A esto se le suma que las revisiones suelen no especificar el origen del suero (fetal o adulto), tipo de suero (convencional o vaca en estro), procesamiento (filtración, inactivación) o momento y concentración utilizada. La suplementación con 5% de suero de vaca adulta al SOF permitiría una producción aceptable de blastocistos (>40%) morfológicamente similares a los que se desarrollan *in vivo* y sin la acumulación de gotas lipídicas y degeneración mitocondrial (Vajta y col., 2010). La criotolerancia de embriones bovinos cultivados en 5% de suero de vaca adulta fue comparable a la de su contraparte *in vivo* (Vajta y col., 1998). Tampoco se registraron nacimientos con animales con sobrepeso con ese nivel de suero durante el cultivo (Vajta y col., 2010). En los orígenes de la FIV humana, el uso de suero del mismo paciente era una práctica rutinaria sin consecuencias graves aparentes (Thompson y col., 2007). Situación contraria parece ocurrir cuando la concentración de suero aumenta por encima del 10% v/v en el medio de cultivo principalmente respecto de la criotolerancia del embrión y peso posnatal (Rizos y col., 2003). Asimismo la utilización del suero en los medios de vitrificación en concentraciones del 10% y 20% parece resultar beneficiosa y difícil de reemplazar con otros aditivos.

Otro punto controversial es la decisión de renovar o no el medio de cultivo durante el período cultivo de manera parcial o total. Las posibles ventajas de no renovar el medio serían: i) (i) los embriones no sufren ninguna alteración o perturbación; ii) los factores de crecimiento endógenos acumulados se quedan en su lugar; iii) el estrés ambiental es relativo “bajo”; iv) menor laboreo; v) el costo es menor (menos placas y medios); y vi) requiere menos control de calidad. También se

mencionan dos posibles desventajas: i) los nutrientes esenciales no se reemplazan y ii) las toxinas pueden acumularse (Biggers y col., 2005, Biggers y Summers, 2008). La primera desventaja no debería ser un problema importante. Si se utiliza un medio de cultivo no-secuencial para el período completo de cultivo *in vitro*, el suministro de nutrientes es sólo una cuestión de definir la apropiada relación volumen/embrión para garantizar el aprovisionamiento necesario de nutrientes (Ward y col., 2000a, Baltz y Tartia, 2010, Hoelker y col., 2010, Reed, 2012, Wydooghe y col., 2014). La acumulación de sustancias tóxicas puede provenir de embriones muertos o en degradación, envejecimiento del medio, metabolismo embrionario y difusión de sustancias tóxicas del aceite, atmósfera o del material de la placa de cultivo. Parecería lógico pensar que la renovación del medio podría prevenir o minimizar la acumulación de sustancias toxinas (Gardner y Lane, 2002). Sin embargo, no hay datos o signos de que los embriones muertos o en degradación afecten el desarrollo de los embriones vecinos (Machtinger y Racowsky, 2012) y el remplazo de la glutamina inestable por el dipeptido estable previene la generación de amonio producto del metabolismo embrionario (Biggers y Summers, 2008, Gardner, 2008, Wale y Gardner, 2016).

Otro punto fuerte de discusión se refiere a la hipótesis planteada por un investigador referida a que la supervivencia del embrión preimplantacional es mayor cuando el metabolismo se encuentra a un nivel relativamente bajo, situación que se logra reduciendo las concentraciones de nutrientes en los medios de cultivo y fomentando el uso de recursos endógenos (Leese, 2002). Ciertos sistemas de cultivo *in vitro* incrementan la actividad metabólica y comprometen la capacidad de desarrollo del desarrollo debido a la formación de ROS. La reducción del metabolismo por agentes específicos, incluyendo oxígeno atmosférico y sustancias químicas que bloquean el metabolismo oxidativo, mejorarían el desarrollo embrionario (Gardner, 2008). En los ovarios y oviductos la temperatura pareciera ser más fría en comparación con los tejidos circundantes, y la diferencia sería mayor alrededor del momento de ovulación (Hunter, 2012b). Como consecuencia probable de este enfriamiento sería una disminución del metabolismo embrionario y posiblemente una mejora en la calidad del embrión. Sin embargo, esta teoría o hipótesis del "embrión tranquilo" ha sido cuestionada por publicaciones que muestran que cierto nivel de estrés sobre el embrión podría resultar beneficioso (Pribenszky y col., 2012). La argumentación sería que el estrés de magnitud variable, sin control y continuo, puede causar daños graves y debería evitarse. Sin embargo, bajo determinadas circunstancias, una acción estresante, bien definida y correctamente aplicada puede ayudar a los gametos y embriones a

aumentar su tolerancia a otras tensiones, incluyendo las manipulaciones durante los procedimientos de laboratorio, cambios de temperatura y pH y el congelamiento, entre otras.

Según las estadísticas anuales presentadas por la IETS, en los últimos años, más de 350.000 embriones bovinos producidos *in vitro* fueron transferidos en todo el mundo. Del total de embriones transferidos, alrededor del 80% fueron transferidos frescos (ver **Tabla 10**). Esto refleja el hecho de que los embriones producidos *in vitro* tienen menor criotolerancia que los originados *in vivo*. Inicialmente, la cantidad de embriones congelados transferidos era prácticamente similar a los embriones frescos. Esta situación estaría ligada al uso de co-cultivo. En tanto, en los últimos años (2014-2015) se registró nuevamente un aumento en la cantidad de embriones congelados transferibles, posiblemente debido al uso de medios de cultivo sin (o bajo) suero fetal y con aditivos específicos, promotores de la calidad embrionaria.

Tabla 10: Transferencias de embriones PIVE (frescos y congelados) bovinos registrados por la International Embryo Transfer Society a nivel mundial (IETS, http://www.iets.org/comm_data.asp)

Año	Embriones Producidos	Embriones Transferidos	Transferidos Frescos	Transferidos Congelados	Relación Fresco:Congelado
1997	41.632	30.569	12.018	18.551	39%
1998	85.026	31.327	16.269	15.058	52%
2000	168.169	168.169	140.272	27.897	83%
2001	109.205	30.260	15.379	14.881	51%
2002	160.695	83.329	66.951	16.378	80%
2003	341.748	106.220	91.372	14.848	86%
2004	319.086	239.823	128.961	110.862	54%
2005	330.647	265.991	183.477	82.514	69%
2006	441.364	291.845	226.077	65.768	77%
2007	434.581	245.257	215.512	29.745	88%
2008	330.953	254.714	227.800	26.914	89%
2009	376.576	305.949	283.188	22.761	93%
2010	450.149	339.685	315.715	23.970	93%
2011	453.471	373.869	343.927	29.942	92%
2012	443.533	385.471	348.868	36.603	91%
2013	517.587	393.625	358.440	35.185	91%
2014	590.359	364.727	296.666	68.061	81%
2015	612.709	404.173	304.946	99.227	75%

Total	6.039.321	4.315.003	3.575.838	739.165	83%
--------------	------------------	------------------	------------------	----------------	------------

Los suplementos biológicos, tales como el suero o la albúmina sérica bovina, se utilizan comúnmente en los medios de cultivo para mejorar las condiciones sub-óptimas. Sin embargo, se observa un efecto dual, ya que el suero aumenta el número de blastocistos que se desarrollan, pero altera su metabolismo y expresión génica (Rizos y col., 2003). Estos cambios están asociados a la baja tolerancia al congelamiento (Rizos y col., 2002c, Rizos y col., 2008), morfología ultraestructural (Fair y col., 2001b), número de células embrionarias (Trigal y col., 2011), expresión génica (Rizos y col., 2002b, Wrenzycki y col., 2007) y a efectos negativos a largo plazo, como el LOS (Lazzari y col., 2002). Cuando los cigotos bovinos provenientes de IVM-FIV se cultivan *in vivo*, por ejemplo en el oviducto de oveja o coneja, se logra restaurar la facultad de criotolerancia y normalidad en la expresión génica (Pugh y col., 2001, Rizos y col., 2008, Lazzari y col., 2010, Rizos y col., 2010). El efecto de las condiciones de cultivo, ya sea *in vitro* o *in vivo*, sobre el embrión, la activación del genoma embrionario y su transcriptoma tiene alta significancia e impacto en su desarrollo pre y post implantacional (Gad y col., 2012, Coy y Yanagimachi, 2015). El oviducto es el sitio donde se produce la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (Hunter, 2005, Aviles y col., 2010, Coy y col., 2012, Hunter, 2012a). En el oviducto se producen eventos críticos, como almacenamiento de espermatozoides, capacitación, liberación y transporte de espermatozoides, maduración final del ovocito, fertilización, desarrollo embrionario temprano y transporte embrionario al útero (Aguilar y Reyley, 2005). El ambiente oviductal está compuesto principalmente por secreciones de las células epiteliales del oviducto y componentes del plasma sanguíneo (Leese, 1988, Ellington, 1991, Leese y col., 2001). El uso de células epiteliales de oviducto bovino (BOEC) fue un avance importante en el cultivo *in vitro* de embriones bovinos (Gandolfi y Moor, 1987), mostrando efectos positivos sobre el desarrollo y la calidad del embrión (Cordova y col., 2014, Schmaltz-Panneau y col., 2015, Lopera-Vasquez y col., 2016). Recientemente, se publicó que las células oviductales modifican su transcripción en presencia de embriones en desarrollo, demostrando que el co-cultivo BOEC puede ser un modelo adecuado para estudiar la compleja comunicación embrión-endometrio en la especie bovina (Ulbrich y col., 2010, Besenfelder y col., 2012, Schmaltz-Panneau y col., 2014, Maillo y col., 2016). La composición del líquido oviductal es compleja, contiene carbohidratos, iones, lípidos, fosfolípidos y proteínas simples y complejas (Aviles y col., 2010). Algunos de estos componentes son sustratos metabólicos, tales como lactato, piruvato, aminoácidos y glucosa, cuyas concentraciones difieren de las presentes en el líquido uterino y en el suero (Leese y col., 2008b). Las secreciones oviductales (oviductinas, osteopontina, glicodelinas y lactoferrina, entre

otras) afectan la función del ovocito y los espermatozoides (Killian, 2004, Killian, 2011, Coy y col., 2012, Mondejar y col., 2013, Ghersevich y col., 2015, Maillo y col., 2016). Se ha observado que éstas secreciones pueden modificar la zona pelúcida y la ocurrencia de polispermia (Coy y col., 2008a, Coy y col., 2012) y podrían aumentar la tasa de clivaje y formación de blastocistos (Lloyd y col., 2009). Por el contrario, en el bovino, la exposición del ovocito al fluido oviductal antes de la fecundación no tuvo efecto sobre el desarrollo embrionario y las características morfológicas de los blastocistos producidos, pero sí a nivel transcripcional (Cebrian-Serrano y col., 2013). Es claro entonces que existe una necesidad de mejorar las condiciones de cultivo y adaptar estrategias basadas en las condiciones existentes "*in vivo*" para mejorar el desarrollo embrionario. Hasta el momento, la investigación publicada se ha centrado principalmente en mostrar las diferencias de calidad entre blastocistos *in vitro* y sus homólogos *in vivo*. Los estudios que utilizaron el "oviducto" como plataforma de cultivo de embriones mostraron el nivel sub-óptimo del sistema actual de cultivo *in vitro* y lo señalan como principal responsable de la baja tolerancia a la criopreservación (Rizos y col., 2010). La suplementación con fluido oviductal a bajas concentraciones como sustituto del suero durante el cultivo de embriones, puede provocar un aumento en las tasas de desarrollo y mejorar calidad de los embriones en términos de supervivencia post congelado y los patrones de expresión génica (Lopera-Vasquez 2015). Las secreciones embriotróficas del oviducto (Bavister, 1988, Abe y Hoshi, 1997) podrían mejorar la calidad del embrión medida por el número total de células del blastocisto, MCI y la relación MCI:TE, siendo éste un índice importante de supervivencia del embrión post descongelado y correlacionado con la tasa de preñez después de la transferencia (Fleming y col., 2004, Ealy y Yang, 2009).

La mayoría de los medios utilizados para el cultivo de embriones *in vitro* bovinos (Gardner y col., 1994, Thompson y col., 1998, Holm y col., 1999) se han diseñado en base al sustrato de iones, fuentes de energía y composición de aminoácidos presentes en el fluido oviductal (Leese y col., 2008b). Sin embargo, parecería insuficiente la sola adaptación del medio de cultivo sin optimizar las condiciones o ambiente de cultivo (Rizos y col., 2003, Lonergan y col., 2006, Rizos y col., 2008, Lopera-Vasquez y col., 2016, Tkach y Thery, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. Hipótesis General

El aumento de espermatozoides sexados viables recuperados y la mejora en la adquisición de la capacidad fecundante incrementará la tasa de fertilización y desarrollo embrionario en el sistema de producción *in vitro* de embriones bovinos propuesto.

2.2. Objetivos General

El objetivo general de esta tesis es optimizar el uso de semen sexado en PIVE mediante la aplicación de nuevas estrategias para incrementar la dosis inseminante, capacidad fecundante y viabilidad de espermatozoides sexados.

2.3. Objetivos Particulares

- Incrementar el número de espermatozoides sexados viables y mejorar capacidad fecundante de los mismos luego de la descongelación para su utilización en fertilización *in vitro*.
- Optimizar del proceso de producción *in vitro* de embriones utilizando semen sexado.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ESTUDIO 1: *Comparación de diferentes medios de fecundación en un sistema de producción in vitro de embriones bovinos con semen sexado*

3.1.1. *Origen de los materiales químicos*

Todas las sustancias químicas utilizadas en este estudio fueron adquiridas a Sigma-Aldrich Chemical Co. (San Luis, Missouri, USA). De usar otro proveedor, se indicará en el texto.

3.1.2. *Recuperación de ovocitos y maduración in vitro (IVM)*

Los ovarios fueron colectados durante la primavera y verano de un frigorífico (Cargill, Fresno, CA) y transportados al laboratorio en un contenedor térmico con solución salina a ~32°C. Los ovarios fueron lavados varias veces y colocados en un baño maría a 37°C con solución salina atemperada. Los ovocitos fueron aspirados de folículos antrales de entre 2 a 6 mm utilizando agujas pericraneales 21G conectadas a un sistema de vacío. La presión de aspiración fue ajustada para lograr un flujo de 15 mL/min. Los complejos cúmulos-ovocitos (COCs) conteniendo

varias capas de células de cumulo compactas fueron seleccionadas y madurados en grupos de 50, en 400 μ l de medio M199 (pH= 7.35, 290 mOsm) suplementado con ALA-glutamine (0.1 mM), piruvato sódico (0.2 mM), gentamicina (5 μ g mL⁻¹), EGF (50 ng mL⁻¹), oFSH (50 ng mL⁻¹), bLH (3 μ g mL⁻¹), cysteamina (0.1 mM), y 10% FBS (Hyclone). La IVM fue llevada a cabo durante 22-24 h en una atmosfera humidificada de 5% CO₂ en aire a 38.5°C.

3.1.3. Fecundación *in vitro* (FIV)

La fecundación (Día 0) fue realizada utilizando semen sexado hembra (Genex Cooperative, Inc., Shawano, WI). Las pajuelas de semen fueron descongeladas a 37°C por 45 segundos. El contenido de las pajuelas fue colocado en un gradiente de densidad discontinuo 80%/40% (PureSperm, Spectrum Technologies, Healdsburg, CA) y centrifugado a 700g por 15 min a temperatura ambiente. Una segunda centrifugación (300g por 5 min) fue realizada luego de descartar el sobrenadante y el pellet resuspendido en TALP-Sperm (pH= 7.4, 295 mOsm). Grupos de 15-20 COCs expandidos fueron lavados dos veces y ubicados en 50 μ l de medio de fecundación bajo aceite mineral. Los espermatozoides fueron adicionados a cada gota a una concentración final de 1 x 10⁶ mL⁻¹. Todos los medios de fecundación fueron suplementados con BSA (libre de ácidos grasos, 6 mg mL⁻¹), fructosa (90 μ g mL⁻¹), penicilamina (3 μ g mL⁻¹), hipotaurina (11 μ g mL⁻¹) y heparina (20 μ g mL⁻¹). Los ovocitos fueron co-incubados con los espermatozoides por 16-18 h a 38.5°C en una atmosfera humedecida con 5% CO₂ en aire.

3.1.4. Cultivo de embriones *in vitro* (IVC)

Luego de 18 h, los presuntos cigotos fueron mecánicamente desnudados mediante una pipeta con una punta plástica de 170 μ m (Research Instruments Ltd, Cornwall, United Kingdom) y cultivados en grupos de 15-20, en gotas de 50 μ L en KSOMaa (Evolve ZEBV-100, Zenith Biotech, pH= 7.4, 275 mOsm) (Biggers y col., 2000), suplementados con 4 mg mL⁻¹ de BSA, bajo aceite mineral por 9 días. En el día 3, se agregó 3% FBS. Las condiciones de cultivo fueron de 38.5°C en una atmosfera humedecida con 5% CO₂, 5% O₂, y 90% N₂. La tensión de oxígeno fue reducida durante IVC para incrementar la tasa de desarrollo embrionario a estadio de blastocitos (Nakao y Nakatsuji, 1990, Thompson y col., 1990, Voelkel y Hu, 1992). En el día 7 y 9, blastocitos (BL) y embriones eclosionados respectivamente, fueron evaluados morfológicamente de acuerdo a los estándares de la International Embryo Transfer Society (Stringfellow y col., 2010).

3.1.5. *Determinación de la masa celular interna (ICM) y número de células trofoblásticas (CT) en blastocitos*

En el día 7 los blastocitos fueron teñidos mediante inmunofluorescencia con marcadores celulares para ICM y CT (Goissis y Cibelli, 2014). Brevemente, después de lavarlos 3 veces en PBS-PVA (1 mg mL⁻¹ PVA), los BLs fueron fijados en formaldehído al 4% por 10 min, luego lavados en PBS/PVA cinco veces y almacenados a 4°C en PBS/PVA durante aproximadamente una semana). Los BLs fueron permeabilizados con D-PBS al 1% v/v Triton X-100 por 30 min a temperatura ambiente y luego bloqueados con D-PBS con 0.1% Triton X-100, 1% BSA y 10% de suero normal de burro por 2 h. Los embriones fueron entonces incubados durante la noche con anticuerpos primarios a 4°C en D-PBS con 0,1% Triton X-100 y 1% BSA. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-CDX2 (BioGenex AM392-5M) y anti-SOX2 (BioGenex AN579-5M). Después de seis lavados con D-PBS conteniendo 0.1% v/v Triton X-100, los embriones fueron incubados con anticuerpos secundarios: burro anti-ratón Alexa Flour 568 (A10037) y burro anti-conejo Alexa Flour 488 (A21206, Life Technologies) por 1 h a temperatura ambiente. El ADN fue teñido con Hoechst 33342. Luego de teñirlos, los embriones fueron montados en una gota de solución anti-decolorante (ProLong Gold, Invitrogen) y cubiertas con un cubreobjeto. Se tomaron imágenes usando una Olympus FV1000 Laser Scanning Confocal a una magnificación de 40X con paso de 1 µm. El número de núcleos de MCI y CT fueron contados mediante el programa NIH Image J (v.1.40).

3.1.6. *Diseño experimental*

Para examinar los efectos de diferentes medios de fertilización en el desarrollo embrionario, calidad embrionaria, capacidad de eclosión, número total de células y ubicación, los COCs fueron fecundados en M199-FERT (Gibco 11043-023), SOF-FERT (Tervit y col., 1972a) y TALP-FERT (Parrish y col., 1986). Los componentes principales de cada medio de fecundación están especificados en la **Tabla 11**. Semen sexado hembra de tres toros diferentes fue utilizado para fecundar los COCs los cuales fueron asignados al azar a los medios de fecundación en cada sesión de FIV. En cada sesión de FIV, un único toro fue utilizado con todos los medios de fecundación. Cada combinación de medio de fecundación y toro SS fue repetida tres veces. Por cada replica, ovocitos (día -1), clivaje (día 3), BL y calidad (día 7) y tasa de eclosión (día 9)

fueron registrados. Muestras independientes fueron producidas utilizando el mismo protocolo para producir embriones para conteo de células de MCI y CT.

Tabla 11: Componentes de los medios de fecundación *in vitro* (en mM, a menos que se indique lo contrario)

Componente	M199-FERT	SOF-FERT	TALP-FERT
NaCl	117,24	107,7	114
KCl	5,33	7,16	3,2
KH ₂ PO ₄	-	1,19	-
NaH ₂ PO ₄	1,01	-	0,40
MgCl ₂ ·6H ₂ O	-	0,49	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,814	-	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,8	1,17	2,0
NaHCO ₃	26,19	25,0	25,0
Glutathione	0,000163	-	-
Lactato de sodio	-	5,3	10
L-Ácido ascórbico	0,000284	-	-
L-Glutamina	0,685	-	-
Glucosa	5,6	-	-
Aminoácidos (presencia)	SI	NO	NO
Vitaminas (presencia)	SI	NO	NO
Gentamicina	5 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml
Piruvato de sodio	0,2	0,2	0,2
Fructosa	0,5	0,5	0,5
Heparina	20 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml
BSA-FAF	6 mg/ml	6 mg/ml	6 mg/ml
pH (ajustado)	7,4	7,4	7,4
Osmolaridad (mOsm)	292	289	298

3.1.7. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando un modelo general lineal a efectos mixtos con distribuciones binomiales logit-link o distribuciones Poisson log-link de manera de considerar el diseño

experimental completo y limitantes técnicas. Se utilizó el paquete estadístico InfoStat (versión 2011) (Di Rienzo y col., 2015) y R (Team, 2015) para la estimación del modelo, comenzando con la predicción lineal máxima (η) para cada variable de interés (clivaje, blastocitos, eclosión, macizo celular interno y células del trofotodermo):

$$\eta_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha_i \times \beta_j + b_k + b_k \times \alpha_i$$

Donde el predictor lineal η_{ijk} modela como efecto fijo con un media general (μ), la distribución del i -th medio de fertilización (α_i), el j -th efecto del toro (β_j) y el término de la interacción ($\alpha_i \times \beta_j$), mientras que el efecto aleatorio considera el k -th día $b_k \sim N(0, \sigma_d^2)$ contribución a la intercepta y la interacción día con el medio de fertilización $b_k \times \alpha_i \sim N(0, \Sigma)$. Una prueba de verosimilitud fue utilizada para la selección del modelo para las diferentes variables medidas.

La significancia de la diferencia en la media de los tratamientos fue determinada usando el test de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) con corrección de Bonferroni por cada modelo ajustado. La significancia en todos los test fue determinada utilizando un valor $p < 0,05$ (por ejemplo, error tipo I fue determinado a $\alpha = 0,05$).

3.2. ESTUDIO 2: *Efecto de factores hiperactivadores de la motilidad espermática y duración de la co-incubación de gametas sobre el desarrollo de embriones bovinos producidos in vitro utilizando semen sexado*

3.2.1. *Origen de los materiales químicos*

Todos los productos químicos utilizados en este estudio fueron adquiridos a Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); caso contrario, se aclara en el texto.

3.2.2. *Recuperación de ovocitos y maduración in vitro (IVM)*

Los ovarios fueron colectados en un frigorífico cercano (Cargill, Fresno, CA, USA) y transportados al laboratorio en recipientes térmicos rellenos con solución salina a una temperatura de $\sim 32^\circ\text{C}$. Los ovarios se lavaron varias veces y se colocaron en un baño maría a 37°C , en solución salina, para la aspiración de los folículos. Los ovocitos fueron aspirados de folículos antrales de 2 a 6 utilizando una aguja butterfly 21 G conectada a una bomba de vacío. Los complejos cumulos-ovocitos (COCs) conteniendo varias capas de células completas y

compactas fueron seleccionadas y maduradas en grupos de 50 COCs en 400 μ l de medio M199 suplementado con ALA-glutamina (0,1 mM), piruvato de sodio (0,2 mM), gentamicina (5 μ g/mL), EGF (50 ng/mL), oFSH (50 ng/mL), bLH (3 μ g/mL), cisteamina (0,1 mM), y 10% de suero fetal bovino (FBS; Hyclone, GE Healthcare, South Logan, UT, USA). La IVM se realizó por 22-24 hs en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ en aire a 38,5°C.

3.2.3. Fecundación *in vitro* (FIV)

La fecundación (Día 0) se llevó a cabo utilizando semen sexado hembra congelado (Genex Cooperative, Shawano, WI, USA). Las pajuelas fueron descongeladas a 37°C por 45 segundos y el contenido recuperado fue colocado sobre un gradiente de densidad discontinuo 80%/40% (PureSperm; Spectrum Technologies, Healdsburg, CA, USA). La centrifugación (700 \times g por 15 min) se realizó a temperatura ambiente. Una segunda centrifugación (300 \times g por 5 min) se llevó a cabo después de descartar el sobrenadante y re-suspender nuevamente el pellet en TALP-Sperm (pH= 7,4, 295 mOsm) (Parrish y col., 1986, Parrish y col., 1988). Grupos maduros de 15-20 COCs fueron lavados dos veces y colocados en 50 μ L de medio de fecundación. La concentración final de espermatozoides fue ajustada a 1×10^6 espermatozoides/mL mediante un hemocitómetro. El medio de fecundación fue suplementado con BSA (libre de ácidos grasos, 6 mg/mL), fructosa (90 μ g/mL), penicilamina (3 μ g/mL), hipotaurina (11 μ g/mL) y heparina (20 μ g/mL) (Ferré y col., 2016). Los ovocitos fueron co-incubados con los espermatozoides a 38,5°C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂ en aire.

3.2.4. Evaluación del estatus nuclear de los presuntos cigotos

Luego de FIV, los presuntos cigotos fueron desnudados mecánicamente mediante micro-pipeta y lavados tres veces en SOF-Hepes. Luego, un mínimo de 10 cigotos fueron colectados al azar de cada tratamiento y fijados para evaluar polispermia (Experimento 1, n = 580; Experimento 2, n = 720). Los presuntos cigotos seleccionados fueron lavarlos 3 veces en PBS-PVA (1 mg/mL), fijados en formaldehído al 4% por 10 min y luego nuevamente lavados en PBS-PVA cinco veces. La tinción del núcleo se realizó utilizando 100 μ g/mL Hoechst (33342) por 10 min, 3 lavados con PBS-PVA y luego montados en portaobjetos. Las muestras fueron examinadas y clasificadas utilizando un microscopio epifluorescente con 400X de aumento. Los cigotos con dos pronúcleos (PN-2) fueron considerados como si hubiesen sido fecundados normalmente, mientras que aquellos con tres o más pronúcleos (PN-3) fueron considerados como polispermicos.

3.2.5. Cultivo de embriones (IVC)

Los presuntos cigotos fueron desnudados mecánicamente mediante pipeteo rápido y constante a través de un tip de 170 μm de diámetro interno (Research Instruments Ltd., Cornwall, United Kingdom) y cultivados en grupos de 15-20 en gotas de 50 μL de medio optimizado simple de potasio suplementado con aminoácidos (KSOMaa, pH= 7,4, 275 mOsm) (Evolve ZEBV-100, Zenith Biotech, Guilford, CT, USA) por 9 días (Biggers y col., 2000). En el día 3 de cultivo, 3% v/v de FBS fue agregado. Las condiciones de cultivo fueron 38,5 °C en una atmosfera humidificada con 5% CO_2 , 5% O_2 , y 90% N_2 . En el día 7 y 9, se evaluaron morfológicamente blastocitos (BL) y embriones eclosionados respectivamente, de acuerdo a los estándares de la International Embryo Transfer Society (Stringfellow y col., 2010).

3.2.6. Diseño experimental

Experimento 1: Efecto de diferentes factores hiperactivadores de la motilidad espermática sobre el desarrollo embrionario *in vitro*

Para examinar el efecto de diferentes factores hiperactivadores de la motilidad espermática sobre la tasa de divaje, desarrollo embrionario, calidad embrionaria y capacidad de eclosión, el semen sexado fue incubado por 30 min en TALP-Sperm antes de la fecundación con alguno de los siguientes factores: cafeína 10 mM (CA), teofilina 5 mM (TH), cafeína 10 mM y teofilina 5 mM (CA+TH) y sin tratar (Control). Después de la incubación, el semen fue centrifugado para concentrar los espermatozoides (300 $\times\text{g}$ por 5 min). El sobrenadante fue descartado y el pellet fue re-suspendido nuevamente con el medio de fecundación final. Todos los ovocitos maduros fueron fecundados utilizando fluido oviductal sintético modificado SOF-FERT (Tervit y col., 1972b) por 18 hs. La formulación final del SOF-FERT fue: 107,7 mM NaCl, 7,16 mM KCl, 1,19 mM KH_2PO_4 , 0,49 mM MgCl_2 , 1,17 mM CaCl_2 , 5,3 mM lactato de sodio, 25,07 mM NaHCO_3 , 0,20 mM piruvato de sodio, 0,5 mM fructosa, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicina, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ heparina, 6 mg/mL BSA libre de ácidos grasos esenciales. Semen sexado portando cromosomas X de tres toros fue utilizado para fecundar los COCs. Se realizaron tres repeticiones de cada factor de hiperactivación de la motilidad y toro.

Experimento 2: Comparación entre tiempo de co-incubación FIV corto y largo, utilizando dos medios de fecundación sobre el desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*.

Después de la maduración, los ovocitos fueron divididos al azar en cuatro grupos de acuerdo al medio de fecundación (M199-FERT y SOF-FERT) y al tiempo de co-incubación de los ovocitos y espermatozoides (8 hs y 18 hs). Los grupos, M199:8 (n= 1,140), M199:18 (n= 1,140), SOF:8 (n= 1,190) y SOF:18 (n= 1,280) fueron suplementados con el factor hiperactivante de la motilidad espermática que produzca el mejor resultado del experimento previo. Los principales componentes de cada medio de fecundación se muestran en la **Tabla 12**. Semen sexado hembra de tres toros fueron utilizados para fecundar los COCs. Cuatro repeticiones fueron realizadas para todos los tratamientos y toros.

Tabla 12: Componentes de los medios de fecundación *in vitro* M199-FERT y SOF-FERT (en mM, caso contrario se indican las unidades)

Componente	M199-FERT (Gibco 11043-023)	SOF-FERT (Tervit y col., 1972b)
NaCl	117,24	107,7
KCl	5,33	7,16
KH ₂ PO ₄	-	1,19
NaH ₂ PO ₄	1,01	-
MgCl ₂ 6H ₂ O	-	0,49
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,814	-
CaCl ₂ 2H ₂ O	1,8	1,17
NaHCO ₃	26,19	25,0
Glutation	0,000163	-
Lactato sodico	-	5,3
L-ácido ascórbico	0,000284	-
L-glutamina	0,685	-
Glucosa	5,6	-
Aminoácidos (presencia)	SI	NO
Vitaminas (presencia)	SI	NO
Gentamicina	5 µg/mL	5 µg/mL
Na-Pyruvato	0,2	0,2
Fructosa	0,5	0,5

Heparina	20 µg/mL	20 µg/mL
BSA-FAF	6 mg/mL	6 mg/mL
pH (ajustado)	7,4	7,4
Osmolaridad (mOsm)	290-300	280-290

3.2.7. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando un modelo lineal generalizado a efectos mixtos con distribución binomial logit-link para poder considerar el diseño experimental completo y restricciones técnicas. Los paquetes para el análisis estadístico InfoStat (version 2011) (Di Rienzo y col., 2015) y R (Team, 2015) fueron utilizados para la estimación del modelo comenzando con el predictor lineal máximo (η) para cada variable de interés (divaje, cantidad total de blastocitos y grado, eclosión y polispermia) de acuerdo al modelo experimental:

$$\eta_{ijkl} = \mu + \tau_i + b_j + d_k \quad (\text{Experimento 1})$$

$$\eta_{mnlk} = \mu + \alpha_m + \beta_n + \alpha_m \times \beta_n + (1 + \alpha_m + \beta_n + \alpha_m \times \beta_n) \times d_k \quad (\text{Experimento 2})$$

Donde el predictor lineal η_{ijkl} a efectos fijos con una media general (μ), la contribución del i -th tratamiento del activador de la motilidad (τ_i), mientras que el efecto aleatorio de la intercepta considera el j -th toro $b_j \sim N(0, \sigma_b^2)$ y día $d_k \sim N(0, \sigma_d^2)$ para la l -th repetición para el Experimento 1. Por el contrario, el predictor lineal η_{mnlk} del Experimento 2 fue modelado usando los efectos fijos con una media general (μ), el efecto del m -th medio de fecundación (α_m), el n -th tiempo de co-incubación ovocito esperma (β_n) y la interacción ($\alpha_m \times \beta_n$), mientras que los efectos aleatorios consideraron el k -th día $d_k \sim N(0, \Sigma)$ conjuntamente estimado para la intercepta, interacción doble y triple $(1 + \alpha_m + \beta_n + \alpha_m \times \beta_n) \times d_k$ respectivamente.

El modelo a efectos fijos fue realizado mediante análisis de varianza tipo III (ANOVA), con suma de cuadrados utilizando un valor $p < 0,05$ y un test de verosimilitud para la selección del modelo, siguiendo criterio de parsimonia, i.e., obtener el modelo más simple que explique los datos. Las validaciones de las asunciones del modelo final fueron realizadas utilizando cuantil-cuantil y desvíos versus valores predichos.

Resultados del modelo a efectos fijos se presentan como una proporción de la media \pm error estándar para los hiperactivadores de la motilidad (Experimento 1), tiempo, medio de fecundación y la interacción entre el tiempo y medio de fecundación (Experimento 2). Sólo los términos significativos fueron usados para reportar los resultados, i.e., en algunos modelos el resultado de los tratamientos fue similar. Por ejemplo, si en el Experimento 1 no hubo contribución del tratamiento del activador de motilidad, solo mantiene la media general, por lo tanto la proporción es exactamente la misma sin importar que activador fuera utilizado. Sin embargo, si hubiera términos significativos, se determinó luego las diferencias en las proporciones utilizando el test de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) con la corrección de Bonferroni. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% ($P < 0,05$) o con una tendencia al nivel de 90% ($P < 0,1$), y los resultados fueron presentados como superíndice y/o asteriscos para cada grupo, respectivamente.

3.3. ESTUDIO 3: *Efecto de diferentes configuraciones de mini-coloides de densidad en la eficiencia de recuperación y calidad de espermatozoides sexados utilizando un analizador de semen computarizado*

3.3.1. *Origen de los materiales químicos*

Todos los químicos utilizados en este estudio fueron adquiridos a Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), a menos que se aclare otra cosa.

3.3.2. *Muestras de semen sexado*

Las muestras de semen sexado bovino criopreservado de 3 toros fueron obtenidas de un distribuidor comercial de semen bovino (Genex Cooperative, Inc., Shawano, WI). Las pajuelas de semen de cada toro se originaron de la misma partida.

3.3.3. *Descongelamiento de las pajuelas y procesamiento de los espermatozoides*

Las pajuelas de semen sexado fueron descongeladas a 37°C por 45s. Las pajuelas fueron secadas individualmente, el extremo sellado fue removido, y el contenido fue colocado en tubos pre-rotulados de 1,5 mL, calentados a 37°C. El contenido de las pajuelas fue bien

homogeneizado y se midió el volumen. Dos muestras fueron usadas para determinar la concentración total de espermatozoides y su viabilidad (NucleoCounter® SP-100™ Sperm Cell Counter, ChemoMetec, Allerød, Denmark). Alícuotas de cada toro fueron procesadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Januskauskas y col., 1999). Para la concentración de espermatozoides, una alícuota de 5 µl de cada toro fue diluida con 500 µl del reactivo S100 y, después de mezclar, fue colocado en un cassette conteniendo yoduro de propidio (Abraham y col., 2016). El cassette fue insertado en el detector fluorescente y el número total de células de la muestra (T, x10⁶ cells/mL) registrado.

La recuperación de espermatozoides (%) fue calculada usando la siguiente ecuación (1):

$$\text{Recuperación de espermatozoides (\%)} = \frac{\text{Concentración Final} \times \text{Volumen Final}}{\text{Concentración Inicial} \times \text{Volumen Inicial}} \times 100$$

(1)

Para determinar la viabilidad, una alícuota extra de 5 µl de cada toro fue diluida con una solución buffer fosfato (500 µl), pH 7,1, provista por el mismo fabricante (Chemometec, Denmark), antes de colocarlo en otro cassette e insertarlo en el detector fluorescente. Esta vez el instrumento reportó el número de células no viables (N, x10⁶ cells/mL). La viabilidad fue determinada sustrayendo las células no viables del número total de células (T-N), y expresando el resultado como porcentaje. Otra muestra fue colocada en un sistema analizador de espermatozoides computarizado (CASA) (Hamilton-Thorne IVOS, Beverly, MA, USA). El resto de la muestra fue depositada sobre la columna de densidad (PureSperm®, Spectrum Technologies, Healdsburg, CA, USA) para su centrifugación (700xg por 15 min) a temperatura ambiente. Una segunda centrifugación (300xg por 5 min) fue realizada después de descartar el sobrenadante y volver a suspender los espermatozoides en TALP-Sperm (pH= 7,4, 295 mOsm) (Parrish y col., 1985, Parrish y col., 1986). Luego, se midió el volumen del pellet junto con la concentración total y la viabilidad de los espermatozoides, de manera de poder calcular la tasa de recuperación y de viabilidad. El pellet final fue nuevamente resuspendido suavemente, pipeteando manualmente en 100 µl de fluido oviductal sintético modificado SOF-FERT (Tervit y col., 1972a) e incubado a 38,5°C en atmosfera humidificada al 5% CO₂ en aire. La formulación final de SOF-FERT fue la siguiente: 107,7 mM NaCl, 7,16 mM KCl, 1,19 mM KH₂PO₄, 0,49 mM, MgCl₂, 1,17 mM CaCl₂, 5,3 mM lactato de sodio, 25,07 mM NaHCO₃, 0,20 mM piruvato de sodio, 0,5 mM fructosa, 5

$\mu\text{g/mL}$ gentamicina, 20 $\mu\text{g/mL}$ heparina, penicilamina (3 $\mu\text{g/mL}$), hipotaurina (11 $\mu\text{g/mL}$) and 6 mg/mL albumina sérica bovina libre de ácidos grasos esenciales.

3.3.4. *Análisis de la motilidad espermática asistido por computadora (CASA)*

La evaluación de la motilidad espermática y los parámetros relacionados fue realizada utilizando el análisis de espermatozoides computarizado (CASA) que permite una evaluación objetiva de diferentes características de las células (Mortimer, 2000b, Verstegen y col., 2002, Amann y Waberski, 2014, Lu y col., 2014). Muestras de espermatozoides fueron analizados mediante CASA de acuerdo a las siguientes recomendaciones del fabricante equipamiento y en Lenz et al. (2011): captura de imagen, cuadros por segundo = 60, número de imágenes = 30; detección de células, contraste mínimo = 50, tamaño mínimo de célula = 5; valores por defecto, tamaño de la célula = 5, intensidad de la célula = 50; células progresivas, velocidad de trayectoria = 50 $\mu\text{m/s}$, rectitud $\geq 70\%$, células lentas ($\mu\text{m/s}$); velocidad promedio de trayectoria (VAP, $< 30 \mu\text{m/s}$), velocidad en línea recta (VSL, $< 15 \mu\text{m/s}$). Las variables de motilidad medidas con el sistema CASA fueron: porcentaje de motilidad (MOT), porcentaje motilidad progresiva (PMOT), velocidad promedio (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), desplazamiento lateral promedio de la cabeza (ALH, μm), el número de veces que la cabeza del espermatozoide cruza la pasada principal (BCF, Hz), motilidad espermática en línea recta (STR, %), y motilidad espermática lineal (LIN, %). La temperatura fue de 37°C.

La cámara precalentada de 4 compartimentos (Leja, IMV International Corp., Maple Grove, MN, USA) fue cargada de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Dado que los espermatozoides habían sido previamente teñidos con Hoechst 33342 debido al proceso de sexado, el sistema CASA fue programado bajo la opción óptica fluorescente IDENT. El número promedio de espermatozoides analizados por tratamiento fue de 361 ± 121 .

3.3.5. *Diseño Experimental*

Se dispusieron las muestras de cada toro para determinar la concentración de espermatozoides y su viabilidad, utilizando el NucleoCounter. La concentración total de espermatozoides y análisis de viabilidad fueron realizados antes y después de centrifugar por los mini-coloides de densidad (mono-capas continuas y doble-capa discontinuo).

Los mini-coloides para centrifugación por densidad que fueron testeadas fueron: doble-capas discontinuas (45%/90%, 40%/80% y 30%/60%) y mono-capas continuas (40%, 60% y 80%). Los diferentes coloides de densidad se realizaron utilizando PureSperm® 100% y PureSperm® Buffer (PureSperm®, Spectrum Technologies, Healdsburg, CA, USA). En el caso de las doble-capas discontinuas, 500 µl de cada densidad fue colocada cuidadosamente en un micro-tubo de 1,5 mL. En el caso de mono-capas, 1 mL de la capa de densidad fue agregado a un micro-tubo de 1,5 mL. Todos los micro-tubos fueron equilibrados al menos por 15 min (<30 min) en una platina térmica a 37°C antes de cargar el semen. Luego de la segunda centrifugación, una muestra fue analizada por CASA a 0, 2, 4, 6, 8 y 18 hs. Una muestra de semen sexado descongelado de cada toro no fue centrifugada, pero mantenida y evaluada de la misma manera que las muestras centrifugadas y tratadas.

3.3.6. Análisis Estadístico

El análisis estadístico fue realizado utilizando el paquete estadístico InfoStat versión 2015 (Di Rienzo y col., 2015), junto con el paquete R versión 3.2.3 (Team, 2015). Para considerar el diseño experimental completo y las restricciones técnicas, modelos independientes lineales a efectos mixtos fueron estimados. Brevemente, los efectos fijos fueron: la contribución promedio global (μ) de la variable de producción correspondiente; la i -th capa de densidad testada (α_i por 45%/90%, 40%/80%, 30%/60%, 40%, 60% u 80%); el j -th efecto de tiempo lineal ($\beta_j = 0, 2, 4, 6, 8$ y 18 hrs), cuadrático ($\gamma_j = \beta_j^2$) o de tercer grado ($\delta_j = \beta_j^3$); y la interacción doble tiempo por densidad de centrifugación ($\alpha_i \times \beta_j$, $\alpha_i \times \gamma_j$, $\alpha_i \times \delta_j$). Los efectos aleatorios fueron: el k -th toro $b_k \sim N(0, I\sigma_b^2)$, i.e., con distribución normal con medio cero y matriz de varianza (I) por el mismo parámetro σ_b^2 ; y por el l -th error aleatorio de la repetición biológica $g(\varepsilon)_{ijkl}$ el cual fue modelado como errores independientes $g(\varepsilon)_{ijkl} = I(\varepsilon)_{ijkl} = \varepsilon_{ijkl} \sim N(0, I\sigma_\varepsilon^2)$ o errores dependientes cuando la falta de heterocedasticidad fue corregida usando una función de variancia exponencial del tiempo agrupado por toro, i.e., $g_1(\varepsilon)_{ijkl} = \text{varExp}(\text{Time}|\text{Bull})_{ijkl}$ o una función de variancia constante por toro, formalmente, $g_2(\varepsilon)_{ijkl} = \text{varIdent}(\sim 1|\text{Bull})_{ijkl}$. Utilizando las anotaciones antes citadas, los datos de diferentes experimentos (y_{ijkl}) fueron modelados comenzando con el modelo máximo de la ecuación (2):

$$y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_j + \delta_j + \alpha_i \times \beta_j + \alpha_i \times \gamma_j + \alpha_i \times \delta_j + b_k + g(\varepsilon)_{ijkl} \quad (2)$$

La selección del modelo fue realizada utilizando la retro eliminación sobre un test de resultados de verosimilitud, criterio de información Akaike y Bayes bajo el criterio de parsimonia. Las asunciones correspondientes al modelo fueron verificadas utilizando los residuales versus valores predichos y con gráficos Q-Q. Cuando fue requerido, valores atípicos fueron removidos y estimados nuevamente por el modelo. El modelo final utilizó el test marginal de hipótesis con suma de cuadrados tipo III para efectos fijos. El análisis *a posteriori* incluyó la mínima diferencia significativa de Fisher's (LSD) usando valore p ajustados de Bonferroni para cada periodo de tiempo o efecto principal. Todos los test estadísticos, excepto si se aclara otra cosa, fueron a ambos lados, con un corte al 0,05 de significancia estadística. El modelo final ajustado para la recuperación y viabilidad utilizó la ecuación (3), mientras que para las variables CASA fueron modeladas por la ecuación (4) excepto para BCF que tuvo una diferente estructura de covarianza (5).

$$y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + b_k + \varepsilon_{ijkl} \quad (3)$$

$$y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_j + \delta_j + \alpha_i \times \beta_j + \alpha_i \times \gamma_j + \alpha_i \times \delta_j + b_k + g_1(\varepsilon)_{ijkl} \quad (4)$$

$$y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_j + \delta_j + \alpha_i \times \beta_j + \alpha_i \times \gamma_j + \alpha_i \times \delta_j + b_k + g_2(\varepsilon)_{ijkl} \quad (5)$$

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO 1: *Comparación de diferentes medios de fecundación en un sistema de producción in vitro de embriones bovinos con semen sexado*

Efectos del modelo para las diferentes variables medidas se muestran en la **Tabla 13**. Los resultados sugieren que la selección del modelo no es un asunto menor, resultando que no se puede utilizar un mismo modelo a través de los diferentes estadios. La proporción de blastocitos y tasa de eclosión incluyen el medio como efecto fijo y día como aleatorio, mientras que MCI y CT necesitan considerar toro y su interacción con el medio como efecto fijo para modelar apropiadamente los datos colectados.

Tabla 13: Valor p del test de verosimilitud para efectos lineales para los predictores seleccionados

Distribución	Binomial						Poisson
Modelo	CV	Medio	Blastocitos	Eclosión	MCI	TE	Número

		Total	I	II	III				ICM	TE	Total
Medio (α)	a	a	a	e	a	a	a	a	a	a	a
Toro (β)	e		c		b		c	c	e	a	d
Medio x Toro ($\alpha \times \beta$)	c						a	a	a		
Día (b)	a	a	a		a	a	a	a	a	a	a
Medio x Día ($\alpha \times b$)		a								a	a

$a < 0,001$; $b < 0,01$; $c < 0,05$; $d < 0,1$; $e < 1$; Clivaje y proporción total de BL son considerados con respecto al número de ovocitos mientras eclosión es comparado con blastocitos totales. Columnas I, II y III denotan grado de calidad de BL.

En la **Tabla 14** se muestran los valores de clivaje, tasa de BL, calidad de los BL desarrollos, y tasa de eclosión para los 3 diferentes medios de fecundación. Se encontraron diferencias significativas entre M199-FERT y SOF-FERT/TALP-FERT en clivaje, total de blastocitos, BL grado 1 y 3, y la tasa de eclosión. La tasa de blastocitos grado 2 no difirieron significativamente diferentes ($P > 0,05$) entre los medios de fecundación utilizados.

Tabla 14: Producción de embriones luego de la fecundación con semen sexado hembra.

Datos ajustados por el modelo están expresados como proporción de la media \pm desvío estándar. El resultado del test de la mínima diferencia significativa de Fisher está representado como letras superíndice. Proporciones con diferentes letras a través de las columnas difieren significativamente (valor p ajustado por Bonferroni $< 0,05$).

Medio	N	Clivaje	Blastocitos				Eclosión
			Total	Grados			
				I	II	III	
M199-FERT	1.143	0,57 \pm 0,02 ^a	0,09 \pm 0,02 ^a	0,15 \pm 0,04 ^a	0,31 \pm 0,04 ^a	0,58 \pm 0,06 ^a	0,29 \pm 0,07 ^a
SOF-FERT	1.220	0,71 \pm 0,01 ^b	0,20 \pm 0,03 ^b	0,52 \pm 0,05 ^b	0,25 \pm 0,03 ^a	0,21 \pm 0,04 ^b	0,60 \pm 0,06 ^b
TALP-FERT	1.041	0,72 \pm 0,01 ^b	0,19 \pm 0,02 ^b	0,51 \pm 0,05 ^b	0,23 \pm 0,03 ^a	0,20 \pm 0,04 ^b	0,65 \pm 0,06 ^b

El MCI y CT de blastocitos al día 7 fueron afectados por el medio de fertilización (**Tabla 15**). Además, proporciones de MCI y CT fueron significativamente diferentes entre el medio de fecundación M199-FERT y SOF-FERT/TALP-FERT. Embriones derivados de medios de fecundación SOF-FERT y TALP-FERT mostraron un menor MCI y una mayor CT cuando se

compararon con el medio de fecundación M199-FERT. Una muestra representativa de BLs provenientes de cada medio de fecundación y BLs mostrando la tinción diferencial de MCI y CT utilizada para el conteo de células, se presentan en la **Figura 16**.

Tabla 15: Conteo de células MCI y CT en el día 7 de blastocitos obtenidos con diferentes medios de fertilización.

Los datos están expresados como media y proporciones \pm desvío estándar. Los resultados del test de la mínima diferencia significativa de Fisher están representados como superíndices. Número y proporción con diferentes letras a través de columnas difieren significativamente (valores p ajustados por Bonferroni $< 0,05$).

Medio FIV	N	Medias ajustadas del modelo			Proporciones ajustadas del modelo	
		MCI	CT	Total	MCI/Total	CT/Total
M199-FERT	116	24,65 \pm 0,95 ^a	58,73 \pm 3,04 ^a	83,57 \pm 4,12 ^a	0,295 \pm 0,0056 ^a	0,705 \pm 0,0056 ^a
SOF-FERT	105	25,94 \pm 1,00 ^a	68,87 \pm 1,32 ^b	95,07 \pm 1,83 ^b	0,275 \pm 0,0054 ^b	0,725 \pm 0,0054 ^b
TALP-FERT	99	27,76 \pm 1,07 ^b	71,81 \pm 3,50 ^b	99,78 \pm 4,25 ^b	0,278 \pm 0,0054 ^b	0,722 \pm 0,0054 ^b

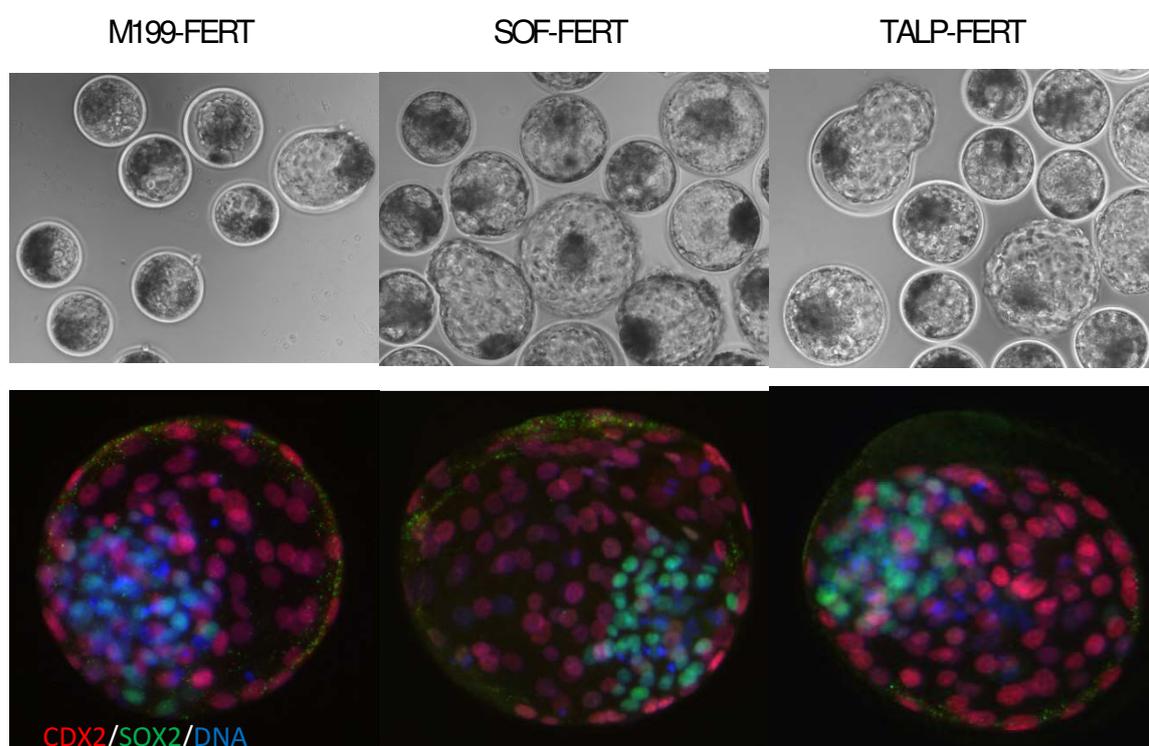


Figura 16: Imágenes representativas de blastocistos fecundados con semen sexado hembra en diferentes medios de fecundación. Fila superior: Imágenes de campo brillante de blastocistos (objetivo 20X) mostrando la diferencia en la calidad de los BLs producidos. Fila inferior: Imágenes representativas de blastocistos teñidos para MCI (anti-SOX2) y CT (anti-CDX2), ADN (Hoechst). Estos marcadores se

utilizaron para determinar el número total de células en blastocistos y el número de células asignadas a MCI y CT (objetivo 40X).

4.2. ESTUDIO 2: *Efecto de factores hiperactivadores de la motilidad espermática y duración de la co-incubación de gametas sobre el desarrollo de embriones bovinos producidos in vitro utilizando semen sexado*

Un total de 3,273 ovocitos bovinos fueron fecundados con semen sexado suplementado con diferentes factores de hiperactivación. El clivaje, desarrollo de blastocitos, calidad de blastocitos y tasa de eclosión de ovocitos bovinos co-incubados por 16-18 h con semen sexado se muestran en la **Tabla 16** (Experimento 1). Se encontró diferencias en la tasas de clivaje entre CA+TH y el control ($P < 0.1$), y el desarrollo de blastocitos fue significativamente mayor ($P < 0.05$) también. Los grados de calidad de blastocitos y la eclosión de embriones no difirió significativamente entre los diferentes factores de hiperactivación espermática.

El clivaje, la tasa de blastocitos, calidad de blastocitos y la tasa de eclosión de ovocitos bovinos co-incubados a diferentes espacios de tiempo con semen sexado (Experimento 2) son presentados en la **Tabla 18**. El grado de los blastocitos y las tasas de eclosión en la Tabla 2 no han sido afectados por los hiperactivadores de la motilidad, de acuerdo a los resultados del modelo. Un comportamiento similar se encontró en el tiempo de co-incubación de las gametas (8 vs. 18 h) en la **Tabla 18**, donde el total de blastocitos, blastocitos grado I y III, y tasa de eclosión tampoco fueron afectados. Más aún, la tasa de blastocitos grado II permaneció constante sin variación, independientemente del tiempo o del medio de fecundación utilizado. Las tasas de clivaje de ovocitos co-incubados con semen sexado fueron significativamente menores ($P < 0,05$) en el periodo de fecundación más corto (8 h), el medio de fecundación M199 y M199-8h, comparado con el tiempo de fecundación más largo (18 h), el medio de fecundación SOF, y los otros grupos de co-incubación, respectivamente. SOF-8h resultó con las mayores tasas de clivaje y producción de blastocitos. El medio de fecundación SOF produjo la mejor calidad de embriones y tasa de eclosión en comparación con M199. Los hiperactivadores de la motilidad (Experimento 1, **Tabla 17**) no afectaron la polispermia, mientras que en el Experimento 2 las tasas de polispermia se vieron incrementadas cuando la fecundación se extendió a 18 h y con el medio de fecundación M199 (**Tabla 19**). La menor tasa de polispermia fue encontrada en el medio de fecundación SOF durante el periodo de fecundación más corto.

Tabla 16: Efecto de los factores de hiperactivación de la motilidad espermática sobre el clivaje, desarrollo embrionario, calidad embrionaria y capacidad de eclosión luego de la fecundación de ovocitos con semen sexado.

Datos ajustados por el modelo están expresados como (promedio \pm error estándar) $\times 100$. Resultados de la mínima diferencia significativa de Fisher's se presentan con superíndice. Diferentes superíndices a lo largo de las columnas difieren significativamente (test ajustado de Bonferroni), con valor-p < 0,05 en letras (a, b) o valor-p < 0,1 con símbolos (*, **).

Hiperactivadores de la motilidad	Ovocitos (n)	Clivaje (Día 3)	Blastocitos (Día 7)			Eclosión (Día 9)	
			Total	Grado			
				I	II		III
CA	842	72,36 \pm 1,79 ^{*,**}	23,94 \pm 3,01 ^{a,b}	57,06 \pm 1,84	23,80 \pm 1,55	19,06 \pm 1,57	65,02 \pm 1,73
TH	887	74,02 \pm 1,80 ^{*,**}	23,43 \pm 3,01 ^{a,b}				
TH + CA	779	77,13 \pm 1,71 [*]	27,26 \pm 3,28 ^a				
CONTROL	765	71,12 \pm 1,79 ^{**}	20,94 \pm 2,75 ^b				

Tabla 17: Efecto de los hiperactivadores de la motilidad espermática sobre la tasa de polispermia luego de la fecundación de ovocitos con semen sexado.

Datos ajustados por el modelo están expresados como (promedio \pm error estándar) $\times 100$. Resultados de la mínima diferencia significativa de Fisher's con el test ajustado de Bonferroni, con valor-p < 0,05 representado con letras.

Hiperactivadores de la motilidad espermática	Ovocitos (n)	Polispermia
CA	145	4,83 \pm 1,78 ^a
TH	145	6,21 \pm 2,00 ^a
TH + CA	145	6,90 \pm 2,10 ^a
Control	145	2,76 \pm 1,36 ^a

Tabla 18: Efecto del tiempo de co-incubación y medio de fecundación sobre el desarrollo embrionario luego de la fecundación de ovocitos con semen sexado.

Datos ajustados por el modelo están expresados como (promedio \pm error estándar) $\times 100$. Resultados de la mínima diferencia significativa de Fisher's con el test ajustado de Bonferroni, con valor-p $< 0,05$ representado con letras. Diferentes letras difieren significativamente (valor-p ajustado de Bonferroni $< 0,05$).

Variables		Tiempo (hs)		Medio de Fecundación		Medio de Fecundación x Tiempo				
		8	18	SOF	M199	SOF:8	SOF:18	M199:8	M199:18	
		n= 2330	n= 2420	n= 2470	n= 2280	n= 1190	n= 1280	n= 1140	n= 1140	
Clivaje		58,42 \pm 3,09 ^b	67,39 \pm 3,73 ^a	71,30 \pm 3,29 ^a	53,89 \pm 3,72 ^b	73,54 \pm 2,96 ^a	68,95 \pm 4,20 ^a	41,53 \pm 5,43 ^b	65,79 \pm 3,88 ^a	
Blastocitos	Total (Día 7)	18,21 \pm 2,80		25,89 \pm 3,64 ^a	15,00 \pm 2,13 ^b	29,28 \pm 4,82 ^a	22,77 \pm 2,90 ^{a,b}	12,27 \pm 2,27 ^c	18,21 \pm 2,80 ^{b,c}	
	Grado	I	35,04 \pm 7,43		49,76 \pm 5,33 ^a	25,45 \pm 8,60 ^b	49,64 \pm 5,45 ^a	49,89 \pm 6,36 ^a	28,50 \pm 10,01 ^{a,b}	22,62 \pm 8,28 ^b
		II	27,78 \pm 1,40							
		III	28,41 \pm 4,67		18,43 \pm 2,80 ^b	38,38 \pm 5,98 ^a	17,78 \pm 3,23 ^b	19,09 \pm 3,34 ^b	36,76 \pm 5,68 ^a	40,03 \pm 7,73 ^a
Eclosión (Día 9)		55,69 \pm 4,34		65,56 \pm 3,81 ^a	45,34 \pm 4,37 ^b	65,56 \pm 3,81 ^a		45,34 \pm 4,37 ^b		

Tabla 19: Efecto de la duración de la co-incubación de ovocitos y espermatozoides, y medio de fecundación sobre la tasa de polispermia luego de la fecundación con semen sexado.

Datos ajustados por el modelo están expresados como (promedio \pm error estándar) $\times 100$. Resultados de la mínima diferencia significativa de Fisher's con el test ajustado de Bonferroni. Diferentes letras difieren significativamente (valor-p $< 0,05$).

Variable	Tiempo (h)		Medio de Fecundación		Medio de Fecundación x Tiempo			
	8	18	SOF	M199	SOF:8	SOF:18	M199:8	M199:18
	n= 360	n= 360	n= 360	n= 360	n= 180	n= 180	n= 180	n= 180
Polispermia	2,68 \pm 0,91 ^b	8,87 \pm 1,60 ^a	3,28 \pm 1,09 ^b	7,32 \pm 1,54 ^a	1,89 \pm 1,04 ^b	5,64 \pm 1,83 ^{a,b}	3,79 \pm 1,44 ^b	13,69 \pm 2,67 ^a

4.3. ESTUDIO 3: *Efecto de diferentes configuraciones de mini-coloides de densidad en la eficiencia de recuperación y calidad de espermatozoides sexados utilizando un analizador de semen computarizado*

La configuración de los mini-coloides de densidad claramente afectaron la recuperación de espermatozoides (**Figura 17**), su viabilidad (**Figura 18**) y funcionalidad (**Tabla 20, Tabla 21, Tabla 22, Tabla 23**). Las variables analizadas por CASA no dependieron del tiempo o sus interacciones, de acuerdo a la ecuación (3). La tasa de recuperación de espermatozoides para los diferentes tratamientos mostraron un claro patrón descendiente a medida que aumenta la densidad de los coloides (**Figura 17A**). Cabe resaltar que el tratamiento 45%/90% es considerado como el “estándar del mercado” al ser el más utilizado por los laboratorios. Dicha doble-capa de densidad discontinua tuvo el mayor rango (41%), mayor desvío estándar (10%) y la menor tasa de recuperación (52%). Además, los tratamientos mono-capas de densidad continuos tuvieron mejores resultados que las configuraciones de doble-capa de densidad discontinua como se muestra en la **Figura 17B** y formalmente ratificados por los resultados del modelo en **Figura 17C**. Más específicamente, grupos de LSD A, B y C tuvieron mayor o iguales tasas de recuperación que C, CD and D, como se muestra en la **Figura 17D**, respecto al número de capas de densidad utilizado. La más alta recuperación de espermatozoides sexados ($P < 0,05$) fue lograda utilizando la mono-capa 40% de densidad ($0,78 \pm 0,02$) seguida por la mono-capa 80% ($0,68 \pm 0,02$), **Figura 17C**. La recuperación de espermatozoides más baja fue obtenida con la configuración de densidad 45%/90% ($0,46 \pm 0,02$). Las mono-capas de densidad continuas recuperaron más espermatozoides sexados ($0,69 \pm 0,02$) que las doble-capas discontinuas ($P < 0,0001$) (**Figura 17D**). Por otro lado, la tasa de viabilidad de espermatozoides sexados no mostró un patrón claro ni en su media ni en la varianza (**Figura 18A y Figura 18B**). El semen no centrifugado, las mono-capas de densidad continua de 40% y 60% y la doble-capa discontinua 45%/90% mostraron la mayor variabilidad en comparación con las otras configuraciones. La mono-capa de densidad continua de 80% mostró la mayor tasa de viabilidad ($0,72 \pm 0,03$), mientras que 40%, 60% y 30%/60% produjeron los resultados de menor viabilidad (**Figura 18C**). No se encontró diferencias en la viabilidad espermática entre capas de densidad continuas y discontinuas ($P = 0,59$, **Figura 18D**). Los resultados CASA para los parámetros de motilidad de las ecuaciones (4 y 5) se resumen en las **Tabla 20, Tabla 21, Tabla 22 y Tabla 23**.

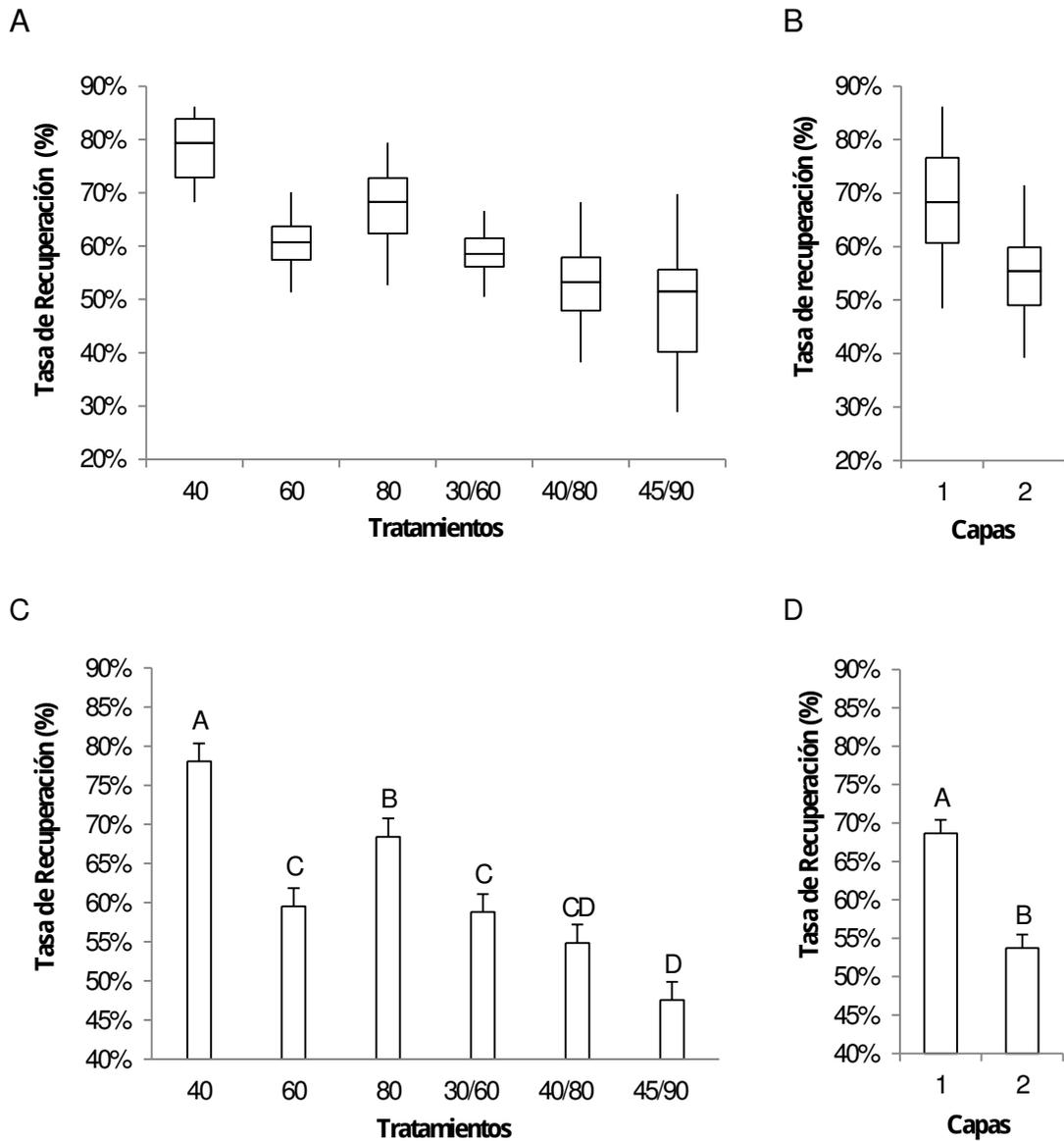


Figura 17: Tasa de recuperación para semen sexado luego de la centrifugación a través de diferentes capas de densidad de PureSperm®. Los boxplot de la tasa de recuperación bruta son presentados para los seis tratamientos de configuración de capas de densidad testeados y agrupados por el número de capas en gráficos A y B, respectivamente. Media del modelo ajustada \pm estimación del error estándar son presentados en los gráficos C y D para las mismas configuraciones de los gráficos A y B, respectivamente. Los resultados del test de mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) están representados con letras (Bonferroni ajustado $P < 0,05$).

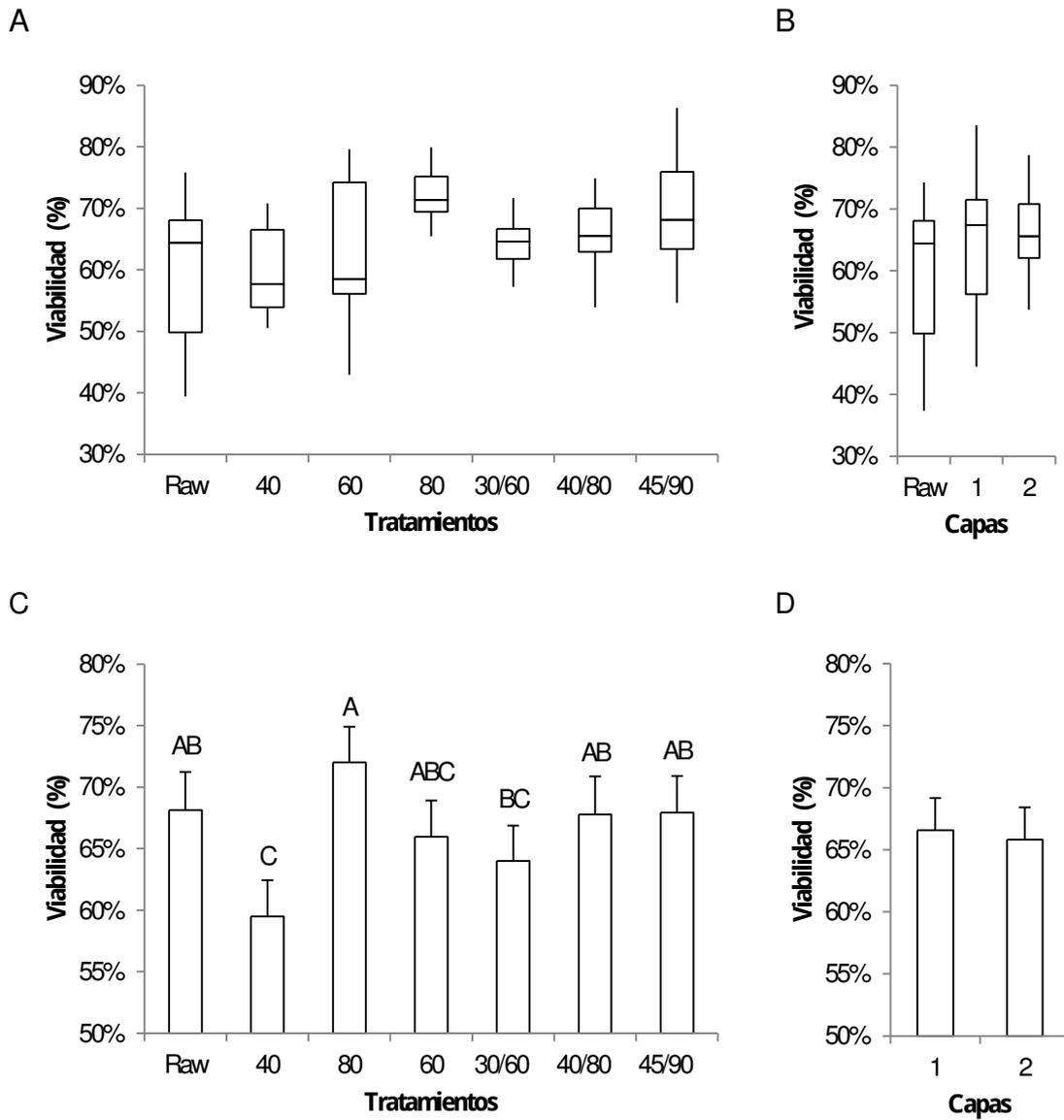


Figura 18: Tasa de viabilidad para semen sexado luego de la centrifugación a través de diferentes capas de densidad de PureSperm®. Boxplots de la tasa de viabilidad bruta de los seis tratamientos de configuración de capas de densidad testeados y agrupados por el número de capas en gráficos A y B, respectivamente. Media del modelo ajustado \pm estimación del error estándar son presentados en los gráficos C y D para las mismas configuraciones de los gráficos A y B, respectivamente. Los resultados del test de mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) están representados con letras (Bonferroni ajustado $P < 0,05$).

Tabla 20: Velocidad promedio de trayectoria (VAP), velocidad en línea recta (VSL) y velocidad curvilínea (VCL) fueron determinadas utilizando un analizador espermático asistido por computadora Hamilton-Thorne IVOS luego que el semen sexado fuera centrifugado a través de una mono-capa de densidad continua o doble-capa de densidad discontinua de PureSperm® o sin centrifugación (sin tratar).

Los datos ajustados por el modelo están expresados como proporción media \pm estimación estándar del error. Resultados del test de la mínima diferencia significativa de Fisher son presentados como letras superíndice. Proporciones con diferente letras a lo largo de cada columna difieren significativamente (Bonferroni ajustado $P < 0,05$).

Tratamiento	VAP ($\mu\text{m/s}$)						VSL ($\mu\text{m/s}$)						VCL ($\mu\text{m/s}$)					
	0h	2h	4h	6h	8h	18h	0h	2h	4h	6h	8h	18h	0h	2h	4h	6h	8h	18h
Sin tratar	50.01 \pm 1.85 ^A	36.42 \pm 0.98 ^B	27.31 \pm 0.97 ^C	21.68 \pm 0.72 ^C	18.64 \pm 0.8 ^{BCD}	9.32 \pm 0. 27 ^A	43.64 \pm 1.93 ^A	32.37 \pm 1.01 ^C	23.93 \pm 0.99 ^C	17.88 \pm 0.74 ^C	13.78 \pm 0.84 ^B	6.82 \pm 0. 3 ^A	76.3 \pm 2. 53 ^A	61.58 \pm 1.52 ^B	50.34 \pm 1.58 ^C	42.08 \pm 1.26 ^C	36.28 \pm 1.68 ^{AB}	26.21 \pm 1.02 ^A
40%	41.31 \pm 1.84 ^B	39.97 \pm 0.95 ^{AB}	34.88 \pm 0.9 ^A	27.39 \pm 0.65 ^A	18.88 \pm 0.76 ^{BC}	8.96 \pm 0. 27 ^{AB}	33.86 \pm 1.92 ^B	35.19 \pm 1 ^B	30.73 \pm 0.94 ^A	22.48 \pm 0.69 ^A	12.45 \pm 0.83 ^{BC}	5.48 \pm 0. 29 ^B	66.78 \pm 2.52 ^A	66.93 \pm 1.51 ^{AB}	60.19 \pm 1.53 ^A	49.03 \pm 1.18 ^A	35.89 \pm 1.6 ^B	26.71 \pm 0.99 ^A
60%	42.54 \pm 1.81 ^{AB}	39.26 \pm 0.95 ^B	32.58 \pm 0.9 ^{AB}	23.91 \pm 0.65 ^{BC}	14.64 \pm 0.78 ^E	8.72 \pm 0. 27 ^{AB}	35.07 \pm 1.89 ^B	34.02 \pm 0.99 ^{BC}	28.29 \pm 0.94 ^{AB}	19.66 \pm 0.69 ^{ABC}	9.89 \pm 0. 82 ^C	6.23 \pm 0. 3 ^{AB}	69.02 \pm 2.48 ^A	64.11 \pm 1.5 ^{AB}	55.11 \pm 1.53 ^{ABC}	43.75 \pm 1.18 ^{BC}	31.83 \pm 1.64 ^B	25.73 \pm 1.02 ^A
80%	49.35 \pm 1.81 ^A	43.99 \pm 0.95 ^A	35.64 \pm 0.9 ^A	25.68 \pm 0.65 ^{AB}	15.45 \pm 0.79 ^{DE}	7.88 \pm 0. 26 ^B	43.58 \pm 1.89 ^A	39.84 \pm 0.99 ^A	31.76 \pm 0.94 ^A	21.16 \pm 0.69 ^{AB}	9.82 \pm 0. 83 ^C	4.99 \pm 0. 3 ^B	75.64 \pm 2.48 ^A	68.66 \pm 1.51 ^A	57.99 \pm 1.53 ^{AB}	45.33 \pm 1.19 ^{ABC}	32.41 \pm 1.66 ^B	23.71 \pm 1.06 ^A
30%/60%	43.81 \pm 1.81 ^{AB}	39.95 \pm 0.95 ^{AB}	34.37 \pm 0.94 ^A	27.81 \pm 0.7 ^A	21.01 \pm 0.8 ^{AB}	9.26 \pm 0. 27 ^A	38.61 \pm 1.88 ^{AB}	34.31 \pm 0.98 ^{BC}	28.23 \pm 0.93 ^{AB}	21.22 \pm 0.68 ^{AB}	14.1 \pm 0. 83 ^B	5.75 \pm 0. 31 ^{AB}	70.82 \pm 2.48 ^A	65.03 \pm 1.49 ^{AB}	56.66 \pm 1.52 ^{ABC}	46.91 \pm 1.19 ^{ABC}	36.98 \pm 1.66 ^{AB}	26.77 \pm 1.02 ^A
40%/80%	49.54 \pm 1.81 ^A	37.76 \pm 0.95 ^B	30.26 \pm 0.91 ^{BC}	25.98 \pm 0.66 ^{AB}	23.89 \pm 0.78 ^A	9.51 \pm 0. 27 ^A	43.58 \pm 1.89 ^A	33.77 \pm 0.99 ^{BC}	26.62 \pm 0.94 ^{BC}	21.58 \pm 0.69 ^A	18.11 \pm 0.82 ^A	4.97 \pm 0. 3 ^B	74.15 \pm 2.48 ^A	63.48 \pm 1.5 ^{AB}	54.72 \pm 1.53 ^{ABC}	47.62 \pm 1.18 ^{AB}	41.92 \pm 1.64 ^A	24.97 \pm 1.06 ^A
45%/90%	46.17 \pm 1.8 ^{AB}	36.21 \pm 0.93 ^B	28.25 \pm 0.87 ^C	22.08 \pm 0.62 ^C	17.45 \pm 0.77 ^{CDE}	8.81 \pm 0. 27 ^{AB}	40.32 \pm 1.88 ^{AB}	32.28 \pm 0.97 ^C	24.95 \pm 0.9 ^{BC}	18.48 \pm 0.64 ^{BC}	13 \pm 0.8 1 ^{BC}	5.58 \pm 0. 3 ^{AB}	69.05 \pm 2.47 ^A	60.57 \pm 1.48 ^B	51.54 \pm 1.47 ^{BC}	42.56 \pm 1.12 ^C	34.21 \pm 1.6 ^B	22.58 \pm 1.02 ^A

Tabla 21: Desplazamiento lateral promedio de la cabeza (ALH) y frecuencia de cruce (BCF) fueron determinadas utilizando un analizador espermático asistido por computadora Hamilton-Thorne IVOS luego que el semen sexado fuera centrifugado a través de una mono-capa de densidad continua o doble-capa de densidad discontinua de PureSperm® o sin centrifugación (sin tratar).

Los datos ajustados por el modelo están expresados como proporción media \pm estimación estándar del error. Resultados del test de la mínima diferencia significativa de Fisher son presentados como letras superíndice. Proporciones con diferente letras a lo largo de cada columna difieren significativamente (Bonferroni ajustado $P < 0,05$).

Trata- miento	ALH (μm)						BCF (Hz)					
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	18 h	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	18 h
Sin tratar	3.97 \pm 0.11 ^A	3.66 \pm 0.08 ^{ABC}	3.45 \pm 0.08 ^{AB}	3.32 \pm 0.07 ^A	3.21 \pm 0.11 ^A	1.48 \pm 0.12 ^B	32.48 \pm 0.84 ^A	36.61 \pm 0.57 ^A	38.17 \pm 0.61 ^A	37.97 \pm 0.53 ^A	36.77 \pm 0.8 ^B	42.78 \pm 0.87 ^A
40%	4.31 \pm 0.11 ^A	3.96 \pm 0.08 ^A	3.57 \pm 0.08 ^A	3.18 \pm 0.07 ^{AB}	2.79 \pm 0.1 ^{AB}	2.07 \pm 0.11 ^A	29.63 \pm 0.84 ^A	33.64 \pm 0.57 ^B	35.76 \pm 0.6 ^{AB}	36.45 \pm 0.51 ^A	36.15 \pm 0.77 ^{BC}	35.78 \pm 0.87 ^C
60%	4.13 \pm 0.11 ^A	3.87 \pm 0.08 ^{AB}	3.47 \pm 0.08 ^{AB}	2.97 \pm 0.07 ^{BC}	2.44 \pm 0.11 ^B	1.27 \pm 0.11 ^{BC}	31.85 \pm 0.84 ^A	32.88 \pm 0.57 ^B	34.52 \pm 0.6 ^B	36.51 \pm 0.51 ^A	38.55 \pm 0.78 ^{AB}	40.32 \pm 0.9 ^{AB}
80%	4.24 \pm 0.11 ^A	3.59 \pm 0.08 ^{BC}	3.12 \pm 0.08 ^B	2.79 \pm 0.07 ^C	2.56 \pm 0.11 ^B	1.44 \pm 0.11 ^B	31.85 \pm 0.83 ^A	31.82 \pm 0.58 ^B	33.84 \pm 0.6 ^B	37.11 \pm 0.51 ^A	40.86 \pm 0.79 ^A	39.08 \pm 0.86 ^{ABC}
30%/60%	4.18 \pm 0.11 ^A	3.68 \pm 0.08 ^{ABC}	3.25 \pm 0.08 ^{AB}	2.89 \pm 0.07 ^{BC}	2.56 \pm 0.11 ^B	0.94 \pm 0.12 ^C	29.51 \pm 0.83 ^A	33.06 \pm 0.57 ^B	35.25 \pm 0.6 ^B	36.39 \pm 0.51 ^A	36.79 \pm 0.78 ^B	38.23 \pm 0.87 ^{BC}
40%/80%	4.05 \pm 0.11 ^A	3.66 \pm 0.08 ^{ABC}	3.31 \pm 0.08 ^{AB}	2.98 \pm 0.07 ^{BC}	2.68 \pm 0.1 ^B	1.49 \pm 0.12 ^B	29.78 \pm 0.83 ^A	33.57 \pm 0.57 ^B	35.68 \pm 0.59 ^{AB}	36.53 \pm 0.5 ^A	36.55 \pm 0.78 ^B	39.11 \pm 0.87 ^{ABC}
45%/90%	3.93 \pm 0.11 ^A	3.51 \pm 0.08 ^C	3.21 \pm 0.08 ^B	2.98 \pm 0.06 ^{BC}	2.81 \pm 0.1 ^{AB}	1.23 \pm 0.12 ^{BC}	30.85 \pm 0.84 ^A	33.45 \pm 0.57 ^B	34.28 \pm 0.59 ^B	33.94 \pm 0.48 ^B	33.04 \pm 0.75 ^C	41.55 \pm 0.87 ^{AB}

Tabla 22: Motilidad espermática en línea recta (STR) y motilidad espermática lineal (LIN) fueron determinadas utilizando un analizador espermático asistido por computadora Hamilton-Thorne IVOS luego que el semen sexado fuera centrifugado a través de una mono-capa de densidad continua o doble-capa de densidad discontinua de PureSperm® o sin centrifugación (sin tratar).

Los datos ajustados por el modelo están expresados como proporción media \pm estimación estándar del error. Resultados del test de la mínima diferencia significativa de Fisher son presentados como letras superíndice. Proporciones con diferente letras a lo largo de cada columna difieren significativamente (Bonferroni ajustado $P < 0,05$).

Tratamiento	STR (%)						LIN (%)					
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	18 h	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	18 h
Sin tratar	74.05 \pm 1.19 ^B	76.35 \pm 0.9 ^A	78.26 \pm 0.98 ^A	79.58 \pm 0.92 ^A	80.14 \pm 1.46 ^A	65.05 \pm 2.27 ^A	50.25 \pm 1.03 ^A	45.89 \pm 0.76 ^B	44.08 \pm 0.82 ^{AB}	43.94 \pm 0.75 ^A	44.56 \pm 1.17 ^A	28.22 \pm 1.55 ^A
40%	77.61 \pm 1.18 ^{AB}	75.9 \pm 0.89 ^A	74.45 \pm 0.95 ^{AB}	73.05 \pm 0.86 ^{BC}	71.53 \pm 1.36 ^{BC}	55.26 \pm 2.22 ^B	44.77 \pm 1.03 ^B	45.85 \pm 0.76 ^B	44.65 \pm 0.81 ^{AB}	41.79 \pm 0.7 ^{AB}	37.92 \pm 1.1 ^B	25.41 \pm 1.5 ^A
60%	76.88 \pm 1.16 ^{AB}	76.49 \pm 0.9 ^A	74.23 \pm 0.95 ^{AB}	70.74 \pm 0.86 ^C	66.66 \pm 1.4 ^{CD}	60.15 \pm 2.22 ^{AB}	44.75 \pm 1.01 ^B	45.41 \pm 0.76 ^B	42.75 \pm 0.8 ^B	37.93 \pm 0.71 ^C	32.1 \pm 1.14 ^C	27.52 \pm 1.52 ^A
80%	78.28 \pm 1.16 ^{AB}	79.17 \pm 0.9 ^A	76.37 \pm 0.95 ^{AB}	71.08 \pm 0.87 ^C	64.49 \pm 1.42 ^D	53.71 \pm 2.22 ^B	48.95 \pm 1.01 ^{AB}	50.06 \pm 0.76 ^A	46.62 \pm 0.8 ^A	40.15 \pm 0.71 ^{BC}	32.22 \pm 1.14 ^C	24.31 \pm 1.52 ^A
30%/60%	78.8 \pm 1.16 ^{AB}	76.64 \pm 0.88 ^A	74.86 \pm 0.94 ^{AB}	73.31 \pm 0.87 ^{BC}	71.86 \pm 1.42 ^{BC}	61.58 \pm 2.27 ^{AB}	46.03 \pm 1.01 ^{AB}	46.03 \pm 0.74 ^B	44.25 \pm 0.79 ^{AB}	41.25 \pm 0.71 ^{AB}	37.57 \pm 1.14 ^B	28.12 \pm 1.55 ^A
40%/80%	80.43 \pm 1.16 ^A	75.85 \pm 0.89 ^A	73.89 \pm 0.95 ^B	73.61 \pm 0.86 ^{BC}	74.1 \pm 1.4 ^{AB}	56.28 \pm 2.27 ^{AB}	50.36 \pm 1.01 ^A	45.71 \pm 0.75 ^B	42.89 \pm 0.8 ^B	41.33 \pm 0.71 ^{AB}	40.42 \pm 1.12 ^{AB}	25.17 \pm 1.57 ^A
45%/90%	79.09 \pm 1.16 ^{AB}	77.11 \pm 0.88 ^A	76.34 \pm 0.93 ^{AB}	76.22 \pm 0.82 ^{AB}	76.14 \pm 1.37 ^{AB}	56.09 \pm 2.27 ^{AB}	50.17 \pm 1.04 ^A	46.33 \pm 0.75 ^B	44.08 \pm 0.78 ^{AB}	42.83 \pm 0.68 ^{AB}	42.02 \pm 1.12 ^{AB}	24.12 \pm 1.6 ^A

Tabla 23: Motilidad (MOT) y motilidad progresiva (PMOT) fueron determinadas utilizando un analizador espermático asistido por computadora Hamilton-Thorne IVOS luego que el semen sexado fuera centrifugado a través de una mono-capa de densidad continua o doble-capa de densidad discontinua de PureSperm® o sin centrifugación (sin tratar).

Los datos ajustados por el modelo están expresados como proporción media \pm estimación estándar del error. Resultados del test de la mínima diferencia significativa de Fisher son presentados como letras superíndice. Proporciones con diferente letras a lo largo de cada columna difieren significativamente (Bonferroni ajustado $P < 0,05$).

Tratamiento	MOT= %						PMOT= %					
	0h	2h	4h	6h	8h	18h	0h	2h	4h	6h	8h	18h
Sin tratar	48.10 \pm 1.68 ^A	29.87 \pm 0.93 ^B	19.47 \pm 0.94 ^B	14.97 \pm 0.71 ^{AB}	14.41 \pm 0.83 ^A	2.52 \pm 0.30 ^{BC}	26.74 \pm 1.11 ^A	16.14 \pm 0.56 ^A	9.59 \pm 0.54 ^{AB}	6.19 \pm 0.40 ^A	5.05 \pm 0.43 ^A	1.89 \pm 0.13 ^A
40%	38.82 \pm 1.67 ^B	24.76 \pm 0.91 ^C	15.60 \pm 0.89 ^B	10.32 \pm 0.65 ^C	7.89 \pm 0.78 ^B	2.94 \pm 0.28 ^{AB}	13.12 \pm 1.10 ^C	8.48 \pm 0.56 ^D	5.16 \pm 0.51 ^D	2.95 \pm 0.37 ^C	1.61 \pm 0.41 ^C	0.45 \pm 0.13 ^{CD}
60%	43.55 \pm 1.64 ^{AB}	28.29 \pm 0.91 ^{BC}	17.92 \pm 0.89 ^B	11.51 \pm 0.65 ^C	8.14 \pm 0.81 ^B	4.03 \pm 0.28 ^A	19.01 \pm 1.09 ^B	13.93 \pm 0.55 ^{AB}	9.64 \pm 0.51 ^A	6.15 \pm 0.37 ^A	3.41 \pm 0.42 ^{AB}	0.49 \pm 0.13 ^{CD}
80%	48.71 \pm 1.64 ^A	34.55 \pm 0.91 ^A	23.69 \pm 0.89 ^A	15.68 \pm 0.66 ^A	10.12 \pm 0.82 ^B	3.95 \pm 0.28 ^A	25.32 \pm 1.10 ^A	16.28 \pm 0.55 ^A	9.84 \pm 0.51 ^A	5.56 \pm 0.37 ^A	3.01 \pm 0.43 ^{BC}	1.08 \pm 0.13 ^B
30%/60%	40.83 \pm 1.64 ^B	27.23 \pm 0.90 ^{BC}	18.05 \pm 0.88 ^B	12.38 \pm 0.65 ^{BC}	9.33 \pm 0.82 ^B	1.56 \pm 0.31 ^C	15.14 \pm 1.08 ^{BC}	10.15 \pm 0.54 ^{CD}	6.36 \pm 0.50 ^{CD}	3.63 \pm 0.37 ^{BC}	1.79 \pm 0.43 ^{BC}	0.44 \pm 0.13 ^D
40%/80%	44.61 \pm 1.64 ^{AB}	28.93 \pm 0.92 ^B	18.39 \pm 0.90 ^B	11.95 \pm 0.66 ^C	8.60 \pm 0.81 ^B	2.07 \pm 0.29 ^{BC}	18.73 \pm 1.10 ^B	11.93 \pm 0.55 ^{BC}	7.41 \pm 0.51 ^{BC}	4.71 \pm 0.37 ^{AB}	3.39 \pm 0.42 ^{ABC}	1.40 \pm 0.13 ^{AB}
45%/90%	49.80 \pm 1.64 ^A	28.32 \pm 0.90 ^{BC}	16.02 \pm 0.86 ^B	10.69 \pm 0.62 ^C	10.14 \pm 0.85 ^B	1.97 \pm 0.28 ^{BC}	25.32 \pm 1.08 ^A	14.58 \pm 0.54 ^A	7.74 \pm 0.48 ^{ABC}	3.99 \pm 0.34 ^{BC}	2.53 \pm 0.42 ^{BC}	1.01 \pm 0.13 ^{BC}

5. DISCUSIÓN

5.1. ESTUDIO 1: *Comparación de diferentes medios de fecundación en un sistema de producción in vitro de embriones bovinos con semen sexado*

La producción de blastocitos de alta calidad, derivados de un sistema PIVE, depende del correcto funcionamiento y desempeño de IVM/FIV/IVC a los fines de asegurar la plena adquisición de habilidad de desarrollo de los ovocitos colectados, y contribuir a producir embriones viables capaces de desarrollarse completamente después de ser transferidos a receptoras sincronizadas. El medio de fecundación juega un rol muy importante para proveer condiciones favorables para la capacitación de los espermatozoides, la unión del espermatozoide a la zona pelúcida, la reacción del acrosoma, la penetración de la zona pelúcida, la unión y fusión del espermatozoide con el ovocito, la activación del cigoto y reacción cortical, endurecimiento de la zona, formación del pronúcleo e iniciación de la división celular (Yanagimachi, 2011, Parrish, 2014). La formulación de los medios también debe contemplar los requerimientos metabólicos tanto para el espermatozoide como el ovocito durante el periodo de incubación y fecundación.

Los resultados del presente estudio demostraron que los embriones bovinos provenientes de ovocitos fecundados con semen sexado hembra, se vieron afectados por el medio de fecundación utilizado, en términos de tasa de desarrollo, calidad morfológica, número total de células y distribución de MCI/CT en los blastocitos. El M199-FERT produjo significativamente menos ovocitos clivados, cigotos y embriones que los medios de fecundación SOF-FERT y TALP-FERT. La calidad embrionaria, medida bajo estándares de la IETS, también resultó afectada en M199-FERT comparado con los otros medios. La diferencia principal entre M199-FERT y SOF-FERT/TALP-FERT utilizado en este estudio como medios de fertilización, son los antioxidantes, carbohidratos y aminoácidos.

El medio TALP es el medio FIV más comúnmente utilizado para ovocitos bovinos (Parrish y col., 1988); sin embargo, modificaciones al SOF (Choi y col., 1991, Gandhi y col., 2000) y al medio Brackett y Oliphant-BO (Brackett y Oliphant, 1975a) han resultado también ser exitosos en FIV para ganado bovino. Utilizado en forma rutinaria como medio de maduración (IVM) de ovocitos, el M199 muestra una formulación más compleja que el TALP-FERT y el SOF-FERT. Un importante componente que falta en la formulación del TALP-FERT y SOF-FERT al compararlos

con M199, es la presencia de un antioxidante (Nedambale y col., 2006a). La acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) pueden generar estrés oxidativo y dañar el funcionamiento fisiológico normal de los espermatozoides (Bansal y Bilaspuri, 2011, Aitken y col., 2012). La alta velocidad del proceso de sexado puede disminuir la vida media de los espermatozoides, aumentar la fragmentación del ADN (Gosálvez y col., 2011b), entre otras injurias. Como resultado de este efecto aditivo, el contenido de ROS puede aumentar significativamente sobre todo cuando la fecundación se realiza durante un período de tiempo prolongado (Johnson y col., 1999, Garner, 2006). La hipótesis inicial fue que el M199-FERT podría tener ventajas comparativas respecto a los otros dos medios, en términos de minimizar el estrés osmótico de los ovocitos maduros como resultado del pasaje entre IVM a FIV, conferir mayor protección a los ovocitos y espermatozoides contra el estrés oxidativo a través de antioxidantes y previniendo el envejecimiento de los ovocitos. Estas ventajas potenciales del M199-FERT no se vieron reflejadas en los parámetros de desarrollo evaluados.

El medio M199 contiene glucosa. Este componente puede interferir con la capacitación del espermatozoide, con la unión del espermatozoide y el ovocito, la penetración de la zona pelúcida, y por lo tanto, afectar la división temprana del cigoto y el desarrollo embrionario subsiguiente (Parrish y col., 1989b). Durante la glicólisis de la glucosa por los espermatozoides bovinos, ocurre una acidificación del pH intracelular (pHi) debido a la generación de H⁺ (Parrish y col., 1989b, Parrish y col., 1994, Vredenburg-Wilberg y Parrish, 1995, Galantino-Homer y col., 2004). Se ha sugerido que la capacitación del espermatozoide bovino está asociada a una ligera alcalinización del pHi y, por esta razón, no se incluye la glucosa en los medios de fecundación para bovinos.

Los aminoácidos no esenciales (NEAA) podrían jugar un rol positivo durante el clivaje de los ovocitos y en la longitud del primer ciclo celular (Rosenkrans y First, 1994, Pinyopummintr y Bavister, 1996b, Pinyopummintr y Bavister, 1996a, Van Winkle, 2001). Una mayor tasa de blastocitos pueden ser alcanzada de cigotos que han clivado de manera temprana (antes de 24 a 30 h) de aquellos que clivan más tarde (>30 a 40 h) (Dinnyes y col., 1999, Lechniak y col., 2008). La suplementación inicial con NEAA podría estimular la tasa de clivaje, la formación de blastocitos y la eclosión, mientras que la adición de aminoácidos esenciales (EAA) podría ser necesaria para estimular la división celular después del estadio de 8 células (Partridge y Leese, 1996, Lane y Gardner, 1997a, Lane y Gardner, 1997b, Lu y col., 1999, Steeves y Gardner, 1999b, Van Winkle, 2001, Zhang y col., 2003). El medio M199-FERT, que contiene NEAA y EAA,

mostró menor clivaje, formación de blastocitos, grado embrionario y habilidad de eclosión en comparación con TALP-FERT y SOF-FERT (ambos libres de aminoácidos).

Se ha reportado que las tasas de clivaje pueden correlacionarse con el desempeño en la producción de blastocitos (Holm y col., 1998, Lonergan y col., 1999a, Ward y col., 2001, Alomar y col., 2006, Barcelo-Fimbres y col., 2011). Este descubrimiento sugiere que un retardo en el primer ciclo de división celular podría impactar negativamente al pasar por el estadio de 8-16 células (momento de la activación del genoma embrionario), y por lo tanto resultar en una tasa de formación de blastocitos más baja. El éxito para superar este estadio crítico, depende no sólo de la contribución de la competencia de los ovocitos para el desarrollo en blastocitos, sino también en la integridad de los espermatozoides, lo que tiene un impacto directo en la formación y calidad del embrión (Parinaud y col., 1993, Ward y col., 2001). El monitoreo continuo del tiempo de FIV y IVC confirmó que la tasa de clivaje de los cigotos estaba correlacionada con la producción de blastocitos (Arav y col., 2008, Pribenszky y col., 2010, Kirkegaard y col., 2012). Estas observaciones concuerdan con nuestros resultados, donde la baja tasa de clivaje en M199-FERT afectó el normal desarrollo a los estadios subsiguientes, tales como formación de blastocitos, calidad de los embriones y habilidad de eclosión.

La cantidad de células del MCI y CT, y la proporción de células CT mostraron que la calidad de los embriones fecundados con M199-FERT estuvo comprometida, en comparación con embriones producidos con los medios de fecundación SOF-FERT y TALP-FERT. La reducción en MCI y número de células CT y la incapacidad de eclosionar de la zona pelúcida por parte de los blastocitos podrían ser signos de incompetencia de desarrollo y afectar negativamente la crioresistencia, además también de la tasa de implantación y de preñez. La competencia de desarrollo y viabilidad de los embriones bovinos producidos *in vitro* es inferior al obtenido *in vivo*, posiblemente debido a una baja calidad de embriones como consecuencia de condiciones de IVM/FIV/IVC sub-óptimas (Rizos y col., 2002c). Hasta el momento, el número de células del MCI y CT han sido utilizadas como indicadores de calidad y viabilidad de embriones PIVE, ya que solo el criterio de evaluación morfológica bajo la lupa estereoscópica podría resultar insuficiente para predecir competencia de desarrollo (Van Soom y col., 1997b).

Existe un periodo de tiempo de fecundación óptimo después de la maduración, y cuando la fecundación no ocurre dentro de esa ventana de tiempo, los ovocitos no fecundados sufrirán un deterioro en su calidad (envejecimiento) (Ottolenghi y col., 2004, Miao y col., 2009, Koyama y

col., 2014a). El impacto de la calidad de los ovocitos en el potencial de desarrollo de los embriones luego de la fecundación puede resultar significativo (Krisher, 2004, Wang y Sun, 2007). El medio M199 puede ser adecuado para la maduración de los ovocitos pero podría retrasar la fecundación, al afectar la capacitación de los espermatozoides, la unión o fusión del ovocito con el espermatozoide, o ambos. La consecuencia final podría ser un ovocito envejecido y no fecundado o un cigoto fecundado pero comprometido, del cual la formación y calidad del blastocito y su tasa de eclosión podrían ser deficientes.

La baja tasa de divaje obtenida con el medio M199-FERT redujo significativamente el número de embriones por gota que continuaron su desarrollo y por lo tanto, que pudiesen interactuar en el micro-ambiente de la placa de IVC. El éxito en el desarrollo de embriones cultivados en grupo puede ser atribuido a la exposición de factores embriotróficos autocrinos y paracrinos (Paria y Dey, 1990a). Los embriones producen y secretan varios factores que podrían afectar la tasa de compactación y cavitación, eclosión, y el número de células del MCI y CT (Gopichandran y Leese, 2006, Richter, 2008, Hegde y Behr, 2012). En el presente estudio, los embriones derivados de los medios de fecundación SOF-FERT y TALP-FERT mostraron mayores tasas de desarrollo, mayor calidad (>blastocitos grado 1), habilidad para eclosionar, y distribución de las células, que aquellos embriones fecundados en M199-FERT, sugiriendo que los medios de fertilización SOF-FERT y TALP-FERT son más capaces de sostener el desarrollo de embriones de mayor calidad.

El principal objetivo al utilizar SS en PIVE, es el de producir el mayor porcentaje de embriones grado 1 al día 7 de IVC. Para alcanzar este porcentaje máximo de blastocitos de alta calidad, el espermatozoide sexado debe someterse a una capacitación para poder alcanzar un estado competente para lograr fecundar al ovocito. Estos cambios involucran la reorganización de proteínas y lípidos de membrana. Estos cambios afectan la fluidez de la membrana plasmática, provocan alteraciones en la concentración iónica intracelular, en el metabolismo y la motilidad, entre otros. El proceso de capacitación termina con la reacción acrosómica e hiperactivación (Parrish y col., 1988, Visconti y col., 1998, Parrish, 2014). Durante el proceso de citometría de flujo para separar espermatozoides portadores del cromosoma X, los espermatozoides sufren diferentes daños tales como la tinción del ADN con un fluorocromo (Hoechst), diluciones, fuerzas centrífugas, alta presión, cargas eléctricas, emisiones laser y congelado/descongelado (Schenk y col., 1999, Suh y col., 2005, Schenk y Seidel, 2007, Rath y col., 2009, Garner y col., 2013). Como consecuencia, la supervivencia de los espermatozoides post-descongelado, su integridad,

el estado del acrosoma, la funcionalidad de sus membranas, el patrón de movimiento (motilidad), la integridad del ADN, entre otros, pueden resultar severamente afectados. Además, el proceso de sexado del semen y/o la criopreservación pueden inducir una capacitación parcial (Lu y Seidel, 2004) y por lo tanto, los protocolos actuales de FIV desarrollados para semen no sexado (convencional) pueden no ser los más apropiados cuando se utiliza para semen sexado.

En conclusión, los diferentes medios de fecundación utilizados con semen sexado afectaron la tasa de clivaje y desarrollo embrionario, como así también la calidad embrionaria y capacidad de eclosión. Los medios de fecundación SOF-FERT y TALP-FERT produjeron más embriones y de mejor calidad que M199-FERT.

5.2. ESTUDIO 2: *Efecto de factores hiperactivadores de la motilidad espermática y duración de la co-incubación de gametas sobre el desarrollo de embriones bovinos producidos in vitro utilizando semen sexado*

Los resultados del presente estudio demostraron que la adición de teofilina y cafeína al semen sexado antes de la fecundación, pueden tener un efecto beneficioso sobre el desarrollo embrionario y la capacidad de eclosión. La capacitación espermática ha sido reconocida como un cambio fisiológico necesario que el espermatozoide debe transitar para adquirir capacidad fecundante (Yanagimachi, 1989, Parrish, 2014). Además, el tiempo de exposición de los ovocitos a los espermatozoides y el medio de fecundación también afectan el clivaje, el desarrollo embrionario, la calidad del embrión y la capacidad de eclosión.

La capacitación es generalmente definida como los cambios que el espermatozoide debe completar para ser capaz de fecundar a un ovocito (Parrish y col., 1988, Yanagimachi, 1994c, Yanagimachi, 1994a, Bailey, 2010, Aitken y Nixon, 2013). La capacitación espermática es un mecanismo que aún no se entiende completamente, pero el proceso incluye cambios bioquímicos y ultra estructurales que llevan a la remoción de factores moduladores o retardantes de la capacitación adheridos a la membrana espermática, cambio en la composición lipídica de la membrana espermática, aumento de la permeabilidad al Ca^{2+} , cambio del pH interno, e incremento de la permeabilidad celular y metabolismo (Fraser, 1998, Visconti y col., 1998, Aitken y Nixon, 2013). La motilidad juega un rol importante en el proceso de fecundación, y es en consecuencia considerada como un parámetro funcional importante durante la evaluación pre y post-congelado. La motilidad es esencial para lograr la penetración de las células del cumulo y la zona pelúcida (ZP) (Gordon, 2003b, Suarez y Ho, 2003, Florman y Ducibella, 2006), siendo la

excepción, dentro de las técnicas de reproducción asistida (ARTs), la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI). El aumento del patrón de motilidad y velocidad, llamado hipermotilidad, resulta como consecuencia de la redistribución de los componentes de la membrana durante la capacitación (Kay y Robertson, 1998). El calcio y el AMPc son los factores más importantes en la regulación de la hiperactivación de los espermatozoides en los mamíferos (Yanagimachi, 1994c, Ho y Suarez, 2001b). El Ca^{2+} es un elemento crítico en el proceso de convertir de simétrico a asimétrico el movimiento del flagelo espermático que es característico de la hiperactivación (Suarez y col., 1991, Suarez y col., 1993, Yanagimachi, 1994c, Ho y Suarez, 2001b, Marquez y Suarez, 2007). La teofilina y cafeína son metilxantinas que pueden causar una acumulación intracelular de AMPc, activar canales permeables al Ca^{2+} en la membrana plasmática del espermatozoide, y han sido ampliamente utilizadas en tecnologías de reproducción asistida como estimulantes de la motilidad (Niwa y Ohgoda, 1988, Park y col., 1989a, Loughlin y Agarwal, 1992, Takahashi y First, 1993, Ho y Suarez, 2001a, Henkel y Schill, 2003, Mortimer y col., 2013). Aunque la heparina por si sola puede alcanzar tasas de clivaje y desarrollo embrionario similares a datos publicados previamente utilizando semen sexado (Lu y col., 1999, Lu y Seidel, 2004), la adición de cafeína y teofilina mejoraron los resultados. Los efectos sinérgicos de las xantinas han sido observados en otros reportes (Niwa y Ohgoda, 1988, Numabe y col., 2001, Kang y col., 2014). Una alta concentración de cafeína (> 2.5 mM) en el medio de fecundación durante todo el período de FIV ha mostrado efectos adversos en el desarrollo embrionario en bovinos (Bird y col., 1989, Momozawa y Fukuda, 2003). Por lo tanto, un tiempo de incubación corto (30 min) previo a la fecundación podría evitar el efecto potencialmente tóxico que las xantinas pudieran provocar, especialmente luego de largos períodos de fecundación (>16 h). El agregado de cafeína y teofilina no aumentó significativamente la tasa de poliesperma (Tabla 3). En otros reportes, tasas normales de 2PN fueron alcanzadas utilizando mezclas de teofilina, D-penicilamina, hipotaurina, y epinefrina (PHE), así como un incremento en el clivaje y el desarrollo embrionario (Kang y col., 2014). En nuestro estudio, la cafeína y la teofilina pueden haber aumentado la penetración del semen sexado al acortar el tiempo de fecundación a través de un aumento en la unión de los ovocitos y espermatozoides. Tal situación puede tener más relevancia en condiciones de baja concentración espermática (ej., semen sexado comparado con semen convencional) y con disminución de la motilidad, ambos factores determinantes durante la fecundación.

El tiempo de exposición durante la co-incubación ovocitos-espermatozoides y el tipo de medio de fecundación utilizado afectaron el clivaje, la polispermia, el desarrollo embrionario, la calidad

embrionaria y la tasa de eclosión. Usualmente, la fecundación del complejo ovocito-cumulo en bovinos con semen convencional no sexado toma entre 18-24 h, a concentraciones de $1-1,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL (Rehman y col., 1994, Ward y col., 2002, Kochhar y col., 2003). Este protocolo de trabajo ha sido ampliamente utilizado hasta ahora principalmente por la practicidad de dejar co-incubando los ovocitos-espermatozoides durante la noche. Sin embargo, acortar el tiempo de la co-incubación a 9-10 h podría resultar beneficioso al incrementar la tasa de clivaje y desarrollo de blastocitos (Ward y col., 2002, Kochhar y col., 2003). Tal flexibilidad con la duración de la fecundación podría ayudar a las operaciones de laboratorios comerciales. Otros protocolos de fecundación reducen el tiempo de co-incubación aún más (<6 h) e incrementan la concentración de espermatozoides drásticamente, hasta 6×10^6 espermatozoides/mL (Brackett y Oliphant, 1975b, Nedambale y col., 2006a). Ambos escenarios, alta concentración de espermatozoides o tiempo de co-incubación extendidos pueden resultar en liberación de ROS debido a un incremento en los espermatozoides muertos, lo que podría inducir al endurecimiento de la zona pelúcida y comprometer la tasa de fecundación y la capacidad de desarrollo embrionaria (Guerin y col., 2001, Kattera y Chen, 2003, Baker y Aitken, 2004, Dalvit y col., 2005b, Agarwal y col., 2006b, Enkhmaa y col., 2009, Lopes y col., 2010b, Tsunoda y col., 2013). Nuestros resultados muestran que el tiempo de co-incubación prolongado resultó en una tasa de clivaje significativamente mayor. No obstante, el desarrollo embrionario, la calidad de los blastocitos y la capacidad de eclosión, no se vieron afectados en comparación con el periodo de fecundación más corto (Tabla 4). Esta observación coincide con reportes previos donde el clivaje aumenta al aumentar el tiempo de exposición ovocito-espermatozoide aunque el desarrollo embrionario no fue afectado (Rehman y col., 1994, Ward y col., 2002, Barcelo-Fimbres y col., 2011). Sin embargo, otros resultados publicados muestran que acortar los tiempos de fecundación podría incrementar tanto la tasa de blastocitos (Kochhar y col., 2003, Nedambale y col., 2006a) como su calidad, medido como la relación ente celular totales y del macizo celular interno o disco embrionario (Nedambale y col., 2006a, Berland y col., 2011). Esto podría ser explicado por el hecho que se utilizó bajas concentraciones de semen sexado (1×10^6 /mL) en lugar de semen convencional, el cual pudo haber tenido un comportamiento diferente durante la fecundación, su interacción con los ovocitos y la subsecuente fusión. Periodos de co-incubación ovocitos-espermatozoides prolongados (>18 h) podría incrementar las tasas de polispermia (Long y col., 1994, Nedambale y col., 2006a, Barcelo-Fimbres y col., 2011), en concordancia con nuestros resultados (**Tabla 19**).

Un estudio reciente (Koyama y col., 2014b) demostró que los ovocitos bovinos adquieren su máxima capacidad de desarrollo alrededor de las 12 hs después de alcanzar la maduración nuclear, es decir casi 30 hs después del inicio de la maduración. Este hallazgo apoyaría el argumento que la co-incubación de ovocitos y espermatozoides durante 8 hs puede lograr resultados de clivaje aceptables. Nuestros resultados confirman esto parcialmente, lo único que difirió significativamente al comparar la fecundación de 8 hs frente a 18 hs fue el clivaje, mientras que se observó un ligero aumento en el clivaje y la formación de blastocistos entre SOF-8h y SOF-18h; lo inverso ocurría entre M199-8h y M199-18h (**Tabla 18**).

En el caso de fecundación en humanos, la preferencia actual es exposición corta con el espermatozoide en contraste con el protocolo tradicional de co-incubación durante toda la noche (Lin y col., 2000, Kattera y Chen, 2003). Sin embargo, es una práctica común dejar un par de capas de células del cúmulo luego de un corto lavado y antes de poner los presuntos cigotos a cultivar, cuando se utilizan protocolos de períodos de fecundación cortos. Esto se debe principalmente a que la remoción de células del cúmulo por pipeteo o agitación/vortex es difícil cuando los ovocitos se encuentran en estadios tempranos de fecundación. Entonces, es probable que algunos espermatozoides permanezcan adheridos a la masa del cumulo y penetre el ovocito más tarde. En nuestro caso, los ovocitos y aún los cigotos fecundados por 8 hs fueron completamente desnudados por un tip plástico especialmente diseñado con un diámetro interno de 170 μm , con el fin de asegurar la remoción completa de las células del cumulus.

El medio de fecundación jugó un rol fundamental en el desempeño general del clivaje, del desarrollo a blastocistos, en la calidad embrionaria, en la capacidad de eclosionar y ocurrencia de polispermia. Cuando un medio de fecundación apto para co-incubación de ovocitos-espermatozoides de duración corta, tal como el Bracket-Oliphant (BO), fue extendido de 6 hs a 18 hs, la producción de blastocistos cayó de forma drástica, mientras que la polispermia aumentó en forma proporcional (Nedambale y col., 2006a). Del mismo modo, un medio de fecundación similar al utilizado en este estudio (IVF-M199) mostró no tener efectos adversos en la tasas de clivaje y desarrollo embrionario luego de prolongar la co-incubación a 18 hs. Aunque se llegó a la misma conclusión sobre el impacto del medio de fecundación, M199-FERT exhibió un desempeño menor en todos los indicadores (clivaje, polispermia, blastocistos, calidad embrionaria y tasa de eclosión) al compararlo con el SOF-FERT. La diferencia principal entre M199-FERT y SOF-FERT utilizado en este estudio son los antioxidantes, carbohidratos y aminoácidos. El medio IVF-M199 arrojó mejores resultados que otros medios de fecundación tradicionales como

BO, KSOM-FERT o TALP (Nedambale y col., 2006a) no solo en la tasa de divaje temprana (2 células), sino también en estadios avanzados de número de células luego de la fecundación (8 células), polispermia, formación de blastocitos, número total de células, tasa de eclosión y supervivencia post-descongelado luego de la vitrificación. En un estudio reciente, utilizando semen sexado, SOF-FERT y TALP-FERT mostraron una mejora significativa sobre M199-FERT como medio de fecundación en términos de tasa de divaje, desarrollo de blastocitos, blastocitos grado 1, tasa de eclosión, y células del macizo celular interno y trofotodermo (Ferré y col., 2016).

Es interesante que el M199-FERT no funcionó tan bien como el SOF-FERT en el presente estudio, ya que M199 contiene antioxidantes como glutatión y ácido L-ascórbico, los cuales faltan en las formulaciones de los medios TALP-FERT y SOF-FERT (Nedambale y col., 2006a). Los antioxidantes son importantes para mitigar la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) el cual puede generar estrés oxidativo y dañar la función fisiológico normal de los espermatozoides (Bansal y Bilaspuri, 2011, Aitken y col., 2012), deterioran la motilidad de los espermatozoides, afectan la integridad de membrana y disminuyen la capacidad de penetración de los ovocitos (Chatterjee y Gagnon, 2001, Aitken y Henkel, 2011, Bansal y Bilaspuri, 2011, Tsunoda y col., 2013). Los antioxidantes también contribuyen al mecanismo de defensa del espermatozoide, comprometido por el proceso de congelación-descongelación, contra los peróxidos de hidrógeno (Agarwal y col., 2006b, Bansal y Bilaspuri, 2011). Sin embargo, M199 también contiene glucosa (Parrish y col., 1989a) la cual puede interferir con la capacitación del espermatozoide, en la unión espermatozoide y la zona pelúcida, afectando la penetración y por ende, en la división temprana del cigoto y el posterior desarrollo embrionario. La hipótesis en el presente estudio fue que, debido a que el M199 contiene antioxidantes, vitaminas, aminoácidos y otros agentes protectores de las células, el desempeño del semen sexado (habiendo sido sometido al procedimiento de citometría de flujo) podría ser mejorado y compensar cualquier efecto potencialmente negativo de la glucosa; sin embargo, esto no sucedió.

Concluimos que agregar hiperactivadores de la motilidad tales como cafeína y teofilina mejoraron las tasas de divaje y desarrollo embrionario sin aumentar la polispermia. También, períodos cortos de co-incubación de ovocitos-espermatozoides resultan en tasas de desarrollo embrionario similares a las obtenidas con intervalos más prolongados (18 hs), facilitando la toma de decisiones a la de elegir un protocolo de fecundación. Además, los datos del presente estudio

sugieren que el SOF-FERT aumentó el clivaje, la formación de blastocitos, la calidad de los embriones y las tasas de eclosión en comparación con M199-FERT.

5.3. ESTUDIO 3: *Efecto de diferentes configuraciones de mini-coloides de densidad en la eficiencia de recuperación y calidad de espermatozoides sexados utilizando un analizador de semen computarizado*

Las pajuelas de semen sexado son usualmente preparadas a baja concentración ($\sim 2,1 \times 10^6$ espermatozoides/mL), y su costo es significativamente mayor que el semen convencional no sexado del mismo toro. Para maximizar la eficiencia de uso del semen sexado en condiciones de fecundación *in vitro*, la selección de una técnica apropiada de separación de espermatozoides es esencial. La centrifugación por densidad separa una fracción específica del semen descongelado. Esta fracción está enriquecida con espermatozoides, libre de plasma seminal, agentes crioprotectores, restos celulares, desechos, células no motiles y bacterias, las que son retenidas en la fracción superior (Avery y Greve, 1995, Parrish y col., 1995, Henkel y Schill, 2003). El presente estudio comparó diferentes capas de densidad de centrifugación (mono/continua y doble/discontinua) basado en su efecto sobre la tasa de recuperación de espermatozoides, viabilidad y múltiples características funcionales de los espermatozoides. Gradientes dobles de Percoll® discontinuos de 45%/90% (Parrish y col., 1995) y triples de 30%/60%/90% (Cesari y col., 2006) ha sido ampliamente utilizados para preparar espermatozoides para la fecundación *in vitro* (Henkel y Schill, 2003, Mendes y col., 2003, Samardzija y col., 2006a, Mortimer y Mortimer, 2013). La centrifugación en mono-capas se presentan como un método alternativo para enriquecer los eyaculados con espermatozoides altamente motiles antes de la criopreservación o enfriamiento, principalmente cuando éstos tienen gran volumen (ej. verraco y padrillo) o cuando el eyaculado es de baja calidad (Gloria y col., 2016). De esta forma, es posible mejorar su aplicación comercial, al aumentar su eficacia, para el mejoramiento animal (Morrell y col., 2011a, Morrell y Wallgren, 2011).

La tasa de recuperación obtenida con todos los coloides de densidad combinados en el presente estudio ($54\% \pm 2\%$), similar a lo encontrado por otros estudios (Rodríguez Villamil y col., 2012). Cabe remarcar, que nuestros resultados muestran que la doble-capa de densidad más popular (45%/90%) presentó la menor tasa de recuperación ($48\% \pm 3\%$), más aún, otros estudios mencionan tasas de recuperación aún más bajas (30-45%) con Percoll® y BoviPure® (Lessley y Garner, 1983, Parrish y col., 1995, Samardzija y col., 2006, Samardzija y col., 2006a, Samardzija

y col., 2006b). Esta baja recuperación no se limita solo a semen bovino sino que también ha sido reportada en humanos (Claassens y col., 1998). Sorprendentemente, tasas de recuperación de espermatozoides muy bajas (<20%) seguido de la centrifugación por coloides de densidad pueden encontrarse también en la literatura científica (Machado y col., 2009). Diferencias en la formulación del coloide, la densidad elegida, número de capas, procedimiento de armado de las capas, condiciones de equilibrio, velocidad de centrifugación, entre otros factores, pueden haber contribuido a las variaciones entre los reportes publicados (Mortimer, 2000a, Henkel y Schill, 2003, Beydola y col., 2013). La mayor tasa de recuperación encontrada con la mono-capa de densidad continua en comparación con las dobles-capas discontinuas podría deberse a la simplicidad y rapidez en su preparación y ejecución (Thys y col., 2009, Morrell y col., 2010, Morrell y col., 2011b). Se requiere un mayor cuidado y precauciones adicionales cuando se prepara dos o más densidades de coloides en un tubo de 1.5 mL para preservar la interface entre las capas. En consecuencia, cualquier grado de mezclado podría llegar a comprometer la eficiencia del procedimiento de selección de espermatozoides.

En el presente estudio, la configuración de densidad 40% continua mostró la tasa de recuperación más alta, a pesar que también mostró la menor viabilidad, indicando que muchos espermatozoides muertos pasaron a través de la columna. En contraste, la mono-capa de densidad continua 80% demostró tener la mejor combinación entre tasa de recuperación y viabilidad con espermatozoides sexados descongelados. Aunque otros autores no encontraron diferencias significativas entre coloides de densidad simples y dobles, mostraron que la recuperación de los sistemas simples (cantidad total de espermatozoides, motilidad y motilidad progresiva) y parámetros de fecundación *in vitro* (divaje, formación de blastocitos y células totales del embrión) mostraron resultados similares a los obtenidos de coloides de densidad discontinuos (Thys y col., 2009) o swim-up (Abraham y col., 2016).

Debido a que el semen sexado puede llegar a presentar características en el patrón de movilidad diferentes al semen convencional, el uso de protocolos de centrifugación con coloides de densidad normalmente utilizados para semen convencional, pueden no ser completamente adecuados para el semen sexado. La combinación de baja concentración de espermatozoides en las pajuelas comerciales y el patrón de movimiento espermático alterado resultan en una ineficiente sedimentación espermática luego de la centrifugación (Dell'Aqua y col., 2006). En consecuencia, si el número de espermatozoides sexados recuperados es bajo, la fecundación de los COCs a la concentración apropiada podría verse comprometida; y por lo tanto, el número de

ovocitos potencialmente fecundables verse reducido. La baja tasa de divaje y formación de blastocitos reportada (Merton y col., 1997, Lu y col., 1999, Zhang y col., 2003, Wilson y col., 2006, Palma y col., 2008, Barcelo-Fimbres y col., 2011, Liu y col., 2015) pueden ser resultado de la baja concentración de espermatozoides obtenida luego de la selección por gradiente de densidad. Por lo tanto, un volumen mínimo de densidad de coloides y una alta velocidad de centrifugación podrían contribuir a mejorar la eficiencia de recuperación post-centrifugado del semen sexado (Dell'Aqua y col., 2006).

El patrón de motilidad espermática es considerado como una de las principales características asociadas al análisis de calidad del semen y su capacidad fecundante (Graham y Mocé, 2005, Petrunkina y col., 2007, Rodriguez-Martinez, 2007b, Mocé y Graham, 2008, Sellem y col., 2015, Li y col., 2016). Solo espermatozoides normales, motiles, no reaccionados y no contaminados son útiles para fecundar ovocitos *in vitro*. Varios reportes muestran que la motilidad espermática y la motilidad progresiva mejoran luego de la centrifugación por coloides de densidad (Mortimer, 1994, Rodriguez-Martinez y col., 1997, Mortimer, 2000a, Henkel y Schill, 2003, Samardzija y col., 2006a, Veznik y col., 2007). Los resultados del presente estudio apoyan esos resultados, donde la motilidad mejoró especialmente con la centrifugación en mono-capa continua al 80% en comparación a la muestra no centrifugada (Tabla 4). Sin embargo, la motilidad progresiva no difirió ente los grupos tratados y su contraparte no centrifugada. Los resultados de las variables de motilidad CASA evaluadas (MOT, PMOT, VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, y LIN) son coincidentes con los datos publicados previamente (Blondin y col., 2009, Carvalho y col., 2010, Lenz y col., 2011), aunque en ninguna de estas publicaciones se realizaron análisis de CASA durante un periodo prolongado de tiempo.

Resumiendo, la mono-capa de densidad continua al 80% resultó ser el método más efectivo en términos de recuperación de espermatozoides y viabilidad. Además, las características principales de motilidad se incrementaron o se mantuvieron elevadas durante el periodo evaluado luego de la centrifugación con la mono-capa de densidad de coloide al 80%. La mini-capa continua al 80% parecería ser una alternativa a la doble-capa discontinua (o configuraciones mayores) para separar espermatozoides sexados mótiles. Estos resultados podrían ser importantes dado que las tasas de desarrollo embrionario con semen sexado en FIV han reportado ser bajas (Lu y col., 1999, Lu y Seidel, 2004, Wilson y col., 2006, Blondin y col., 2009, Bermejo-Alvarez y col., 2010a, Rodriguez Villamil y col., 2012, Trigal y col., 2012) o similares (Zhang y col., 2003, Xu y col., 2006, Peippo y col., 2010) cuando son comparadas con

semen convencional no-sexado del mismo toro. Investigaciones adicionales deberían focalizarse en validar/correlacionar este resultado bajo un sistema de producción de embriones *in vitro* a los fines de maximizar la utilización de pajuelas y mejorar las tasas de producción de blastocitos con semen sexado.

Los resultados de este estudio presentan un protocolo óptimo para la separación del semen sexado que permitiría que más ovocitos sean fecundados por pajuela de semen sexado congelada/descongelada. Estas consideraciones son extremadamente importantes cuando se utiliza semen sexado *in vitro* y cuando es esencial maximizar la eficiencia de recuperación de espermatozoides móviles.

6. CONCLUSIONES

6.1. ESTUDIO 1: *Comparación de diferentes medios de fecundación en un sistema de producción in vitro de embriones bovinos con semen sexado*

El uso de semen sexado en PIVE ha mostrado resultados variables debido a la escasa información disponible sobre las condiciones adecuadas durante la fecundación *in vitro* con semen sexado. El medio de fecundación afectó la tasa de clivaje, desarrollo embrionario, calidad y capacidad de eclosión. Los medios SOF-FERT y TALP-FERT produjeron significativamente más embriones y de más alta calidad que el M199-FERT.

6.2. ESTUDIO 2: *Efecto de factores hiperactivadores de la motilidad espermática y duración de la co-incubación de gametas sobre el desarrollo de embriones bovinos producidos in vitro utilizando semen sexado*

El agregado de hiperactivadores de la motilidad, tales como cafeína y teofilina, mejoraron las tasas de clivaje y desarrollo embrionario sin aumentar la polispermia. También, períodos cortos de co-incubación de ovocitos-espermatozoides resultan en tasas de desarrollo embrionario similares a las obtenidas con intervalos más prolongados (18 hs), facilitando la toma de decisiones a la de elegir un protocolo de fecundación. Además, los datos del presente estudio sugieren que el SOF-FERT aumentó el clivaje, la formación de blastocitos, la calidad de los embriones y las tasas de eclosión en comparación con M199-FERT.

6.3. ESTUDIO 3: *Efecto de diferentes configuraciones de mini-coloides de densidad en la eficiencia de recuperación y calidad de espermatozoides sexados utilizando un analizador de semen computarizado*

La optimización del procedimiento de separación y limpieza del semen sexado congelado podría permitir que más ovocitos sean fecundados por pajuela de semen sexado descongelada. Estas consideraciones son extremadamente importantes cuando se utiliza semen sexado en fecundación *in vitro*, y cuando es esencial maximizar la eficiencia de recuperación de espermatozoides. La mono-capa de densidad continua al 80% resultó ser el método más efectivo en términos de recuperación de espermatozoides y viabilidad. Además, las características principales de motilidad se incrementaron o se mantuvieron elevadas durante el periodo evaluado luego de la centrifugación con la mono-capa de densidad de coloide al 80%. La mini-capa continua al 80% parecería ser una alternativa a la doble-capa discontinua (o configuraciones mayores) para separar espermatozoides sexados mótils.

7. CONCLUSIONES GENERALES

Los diferentes medios de fecundación utilizados con semen sexado afectaron la tasa de clivaje y desarrollo embrionario, como así también la calidad embrionaria y capacidad de eclosión. Los medios de fecundación SOF-FERT y TALP-FERT produjeron más embriones y de mejor calidad que M199-FERT. Los hiperactivadores de la motilidad, como CA y TH mejoraron las tasas de clivaje y desarrollo embrionario, sin aumentar la polispermia, y el acortamiento de la co-incubación espermatozoide-ovocito resultó con similar desempeño en producción embrionaria en comparación al intervalo prolongado (18 hs). La mono-capa de densidad continua al 80% resultó ser un protocolo óptimo para la separación del semen sexado que permitiría que más ovocitos sean fecundados por pajuela de semen sexado congelada/descongelada. Estas consideraciones son extremadamente importantes cuando se utiliza semen sexado *in vitro* y cuando es esencial maximizar la eficiencia de recuperación de espermatozoides mótils. El semen sexado separado mediante la mono-capa de densidad continua al 80% recupera la mayor cantidad de espermatozoides mótils y viables, y la fecundación *in vitro* en SOF-FERT en presencia de agentes hiperactivadores de la motilidad (cafeína y teofilina) produce la mayor cantidad de embriones y de la más alta calidad.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe H, Hoshi H. 1997. Bovine oviductal epithelial cells: their cell culture and applications in studies for reproductive biology. *Cytotechnology* 23: 171-183.
- Abe H, Hoshi H. 2003. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. *Journal of Reproduction and Development* 49: 193-202.
- Abe H, Otoi T, Tachikawa S, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. 1999a. Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro. *Anat Embryol (Berl)* 199: 519-527.
- Abe H, Yamashita S, 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 and Development* 53: 325-335.
- Abe H, Yamashita S, 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 and Development* 61: 57-66.
- Abe S, Shioya Y. 1993. Effect of Temperature during Transportation of Ovaries on the Development of Bovine Follicular Oocytes Matured and Fertilized In Vitro. *Nihon Chikusan Gakkaiho* 64: 32-37.
- Abe S, Shioya Y. 1996. Effects of Temperature and Duration of Preservation of Bovine Ovaries in Physiological Saline on The Development of Bovine Embryos Derived from Follicular Oocytes Matured and Fertilized in vitro. *Nihon Chikusan Gakkaiho* 67: 633-638.
- Abeydeera L R. 2002. In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology* 57: 257-273.
- Abou-Haila A, Tulsiani D R. 2000. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys* 379: 173-182.
- Abraham M C, Johannisson A, Morrell J M. 2016. Effect of sperm preparation on development of bovine blastocyst in vitro. *Zygote* 24: 825-830.
- Absalón-Medina V A, Butler W R, Gilbert R O. 2014. Preimplantation embryo metabolism and culture systems: experience from domestic animals and clinical implications. *J Assist Reprod Genet* 31: 393-409.
- Accardo C, Dattena M, Pilichi S, Mara L, Chessa B, Cappai P. 2004. Effect of recombinant human FSH and LH on in vitro maturation of sheep oocytes; embryo development and viability. *Animal Reproduction Science* 81: 77-86.
- Adamiak S, Powell K, Rooke J, Webb R, Sinclair K. 2006. Body composition, dietary carbohydrates and fatty acids determine post-fertilisation development of bovine oocytes in vitro. *Reproduction* 131: 247-258.
- Adams G P. 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility* 54: 17-32.
- Adams G P, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69: 72-80.
- Adams G P, Matteri R L, Ginther O J. 1992. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 96: 627-640.
- Adams G P, Singh J. 2014. Ovarian Follicular and Luteal Dynamics in Cattle. *Bovine Reproduction*. John Wiley & Sons, Inc. pp. 219-244.
- Adhikari D, Liu K. 2014. The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. *Mol Cell Endocrinol* 382: 480-487.
- Adriaens I, Cortvrindt R, Smits J. 2004. Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence. *Human Reproduction* 19: 398-408.

- Aerts J M J, Bols P E. 2010a. Ovarian Follicular Dynamics. A review with Emphasis on the Bovine Species. Part II: Antral Development, Exogenous Influence and Future Prospects. *Reproduction in Domestic Animals* 45: 180-187.
- Aerts J M J, Bols P E. 2010b. Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. *Reproduction in Domestic Animals* 45: 171-179.
- Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar B J, Shaman A, Gupta S. 2012. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 10: 1-31.
- Agarwal A, Gupta S, Sharma R K. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3: 1-21.
- Agarwal A, Gupta S, Sikka S. 2006a. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 18: 325-332.
- Agarwal A, Said T M, Bedaiwy M A, Banerjee J, Alvarez J G. 2006b. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil Steril* 86: 503-512.
- Agrawal R, Holmes J, Jacobs H S. 2000. Follicle-stimulating hormone or human menopausal gonadotropin for ovarian stimulation in in vitro fertilization cycles: a meta-analysis. *Fertil Steril* 73: 338-343.
- Aguilar J, Reyley M. 2005. The uterine tubal fluid: secretion, composition and biological effects. *Animal Reproduction* 2: 91-105.
- Ahern T J, Gardner D K. 1998. Culturing bovine embryos in groups stimulates blastocyst development and cell allocation to the inner cell mass. *Theriogenology* 49: 194.
- Aitken R J. 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development* 7: 659-668.
- Aitken R J. 2000. Possible redox regulation of sperm motility activation. *J Androl* 21: 491-496.
- Aitken R J, Baker M A. 2006. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol* 250: 66-69.
- Aitken R J, Clarkson J S, Fishel S. 1989. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 41: 183-197.
- Aitken R J, Fisher H. 1994. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* 16: 259-267.
- Aitken R J, Henkel R R. 2011. Sperm cell biology: current perspectives and future prospects. *Asian J Androl* 13: 3-5.
- Aitken R J, Jones K T, Robertson S A. 2012. Reactive Oxygen Species and Sperm Function—In Sickness and In Health. *J Androl* 33: 1096-1106.
- Aitken R J, Krausz C. 2001. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 122: 497-506.
- Aitken R J, Marshall Graves J A. 2002. The future of sex. *Nature* 415: 963.
- Aitken R J, Nixon B. 2013. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Mol Hum Reprod* 19: 785-793.
- Ajduk A, Zernicka-Goetz M. 2012. Advances in embryo selection methods. *F1000 Biol Rep* 4: 1-5.
- Aktas H, Wheeler M, First N, Leibfried-Rutledge M. 1995. Maintenance of meiotic arrest by increasing [cAMP] i may have physiological relevance in bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* 105: 237-245.
- Albertini D F. 2015. The Mammalian Oocyte. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. In: Plant T M, Zeleznik A J (Eds.). Academic Press. San Diego. pp. 59-97.
- Albertini D F, Carabatsos M J. 1998. Comparative aspects of meiotic cell cycle control in mammals. *Journal of Molecular Medicine* 76: 795-799.
- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2013. Sex and Genetics. *Essential Cell Biology*. In: Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (Eds.). Garland Science. New York. pp. 651-687.

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. 2014. The Cell Cycle. *Mol Biol Cell*. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P (Eds.). Garland Science. New York. pp. 963-1020.
- Albuz F K, Sasseville M, Lane M, Armstrong D T, Thompson J G, Gilchrist R B. 2010. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Human Reproduction* 25: 2999-3011.
- Ali A, Bilodeau J, Sirard M. 2003. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 59: 939-949.
- Ali A, Sirard M-A. 2002a. 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.
- Ali A, Sirard M A. 2002b. The effects of 17beta-estradiol and protein supplement on the response to purified and recombinant follicle stimulating hormone in bovine oocytes. *Zygote* 10: 65-71.
- Ali A, Sirard M A. 2005. Protein kinases influence bovine oocyte competence during short-term treatment with recombinant human follicle stimulating hormone. *Reproduction* 130: 303-310.
- Alm H, Torner H, Kanitz W, Roschlau K. 2008. Influence of oocyte recovery method, in vitro fertilization method and serum source on embryonic development of in vitro matured bovine oocytes. *Archives Animal Breeding* 51: 224-234.
- Alomar M, Mahieu J, Verhaeghe B, Defoin L, Donnay I. 2006. Assessment of sperm quality parameters of six bulls showing different abilities to promote embryo development in vitro. *Reproduction, Fertility and Development* 18: 395-402.
- Allworth A E, Albertini D F. 1993. Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. *Dev Biol* 158: 101-112.
- Aman R R, Parks J E. 1994. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro-matured bovine oocytes. *Biol Reprod* 50: 103-110.
- Amann R P. 1989. Treatment of sperm to predetermine sex. *Theriogenology* 31: 49-60.
- Amann R P. 1999. Issues affecting commercialization of sexed sperm. *Theriogenology* 52: 1441-1457.
- Amann R P, Waberski D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81: 5-17.
- Ambrosini G, Andrisani A, Porcu E, Rebellato E, Revelli A, Caserta D, Cosmi E, Marci R, Moscarini M. 2006. Oocytes cryopreservation: state of art. *Reprod Toxicol* 22: 250-262.
- Amsterdam A, Koch Y, Lieberman M E, Lindner H R. 1975. Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *Journal of Cell Biology* 67: 894-900.
- An L, Wu Z H, Wu Y F, Zhang X L, Liu X, Zhu Y B, Cheng W M, Gao H M, Guo M, Tian J H. 2010. Fertility in single-ovulating and superovulated dairy heifers after insemination with low dose sex-sorted sperm. *Reproduction in Domestic Animals* 45: e344-e350.
- Anderiesz C, Ferraretti A, Magli C, Fiorentino A, Fortini D, Gianaroli L, Jones G M, Trounson A O. 2000. Effect of recombinant human gonadotrophins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development in vitro. *Human Reproduction* 15: 1140-1148.
- Andrabi S M H, Maxwell W M C. 2007. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Animal Reproduction Science* 99: 223-243.
- Aoki V W, Peterson C M, Parker-Jones K, Hatasaka H H, Gibson M, Huang I, Carrell D T. 2005. Correlation of sperm penetration assay score with polyspermy rate in in-vitro fertilization. *J Exp Clin Assist Reprod* 2: 1-4.
- Aoyagi Y, Fujii K, Iwazumi Y, Furudate M, Fukui Y, Ono H. 1988. Effects of two treatments on semen from different bulls on in vitro fertilization results of bovine oocytes. *Theriogenology* 30: 973-985.
- Arav A. 2014. Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology* 81: 96-102.

- Arav A, Aroyo A, Yavin S, Roth Z. 2008. Prediction of embryonic developmental competence by time-lapse observation and 'shortest-half' analysis. *Reprod Biomed Online* 17: 669-675.
- Arav A, Rubinsky B, Fletcher G, Seren E. 1993. Cryogenic protection of oocytes with antifreeze proteins. *Molecular Reproduction and Development* 36: 488-493.
- Arlotto T, Schwartz J L, First N L, Leibfried-Rutledge M L. 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 45: 943-956.
- Armstrong D G, Gong J G, Webb R. 2003. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanisms. *Reproduction* 61: 403-414.
- Armstrong D T. 2001. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology* 55: 1303-1322.
- Armstrong D T, Zhang X, Vanderhyden B C, Khamsi F. 1991. Hormonal actions during oocyte maturation influence fertilization and early embryonic development. *Ann N Y Acad Sci* 626: 137-158.
- Ashworth C J, Toma L M, Hunter M G. 2009. Nutritional effects on oocyte and embryo development in mammals: implications for reproductive efficiency and environmental sustainability. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences* 364: 3351-3361.
- Assey R J, Hyttel P, Greve T, Purwantara B. 1994. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Molecular Reproduction and Development* 37: 335-344.
- Assidi M, Richard F J, Sirard M A. 2013. FSH in vitro versus LH in vivo: similar genomic effects on the cumulus. *J Ovarian Res* 6: 1-13.
- Assidi M, Sirard M A. 2013. Oogenesis. Cumulus Cell Gene Expression as a Marker of Oocyte Quality. In: Coticchio G, Albertini D F, De Santis L (Eds.). Springer London. London. pp. 231-252.
- Austin C R. 1951. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Australian Journal of Scientific Research* 4: 581-596.
- Austin C R. 1952. The Capacitation of the Mammalian Sperm. *Nature* 170: 326-326.
- Avery B, Greve T. 1995. Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology* 44: 871-878.
- Aviles M, Gutierrez-Adan A, Coy P. 2010. Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? *Mol Hum Reprod* 16: 896-906.
- Aydiner F, Yetkin C E, Seli E. 2010. Perspectives on emerging biomarkers for non-invasive assessment of embryo viability in assisted reproduction. *Curr Mol Med* 10: 206-215.
- Bączkowski T, Kurzawa R, Głąbowski W. 2004. Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. *Reprod Biol* 4: 5-22.
- Badr H, Bongioni G, Abdoon A S, Kandil O, Puglisi R. 2007. Gene expression in the in vitro-produced preimplantation bovine embryos. *Zygote* 15: 355-367.
- Baerwald A R, Walker R A, Pierson R A. 2009. Growth rates of ovarian follicles during natural menstrual cycles, oral contraception cycles, and ovarian stimulation cycles. *Fertil Steril* 91: 440-449.
- Baguisi A, Behboodi E, Melican D T, Pollock J S, Destrempes M M, Cammuso C, Williams J L, Nims S D, Porter C A, Midura P. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol* 17: 456-461.
- Bahat A, Eisenbach M. 2006. Sperm thermotaxis. *Mol Cell Endocrinol* 252: 115-119.
- Bailey J L. 2010. Factors Regulating Sperm Capacitation. *Syst Biol Reprod Med* 56: 334-348.
- Baker A A, Jillella D. 1978. Techniques of surgical and non-surgical ova collection of superovulated cows. *Veterinary Record* 103: 558-562.
- Baker M A, Aitken R J. 2004. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Mol Cell Endocrinol* 216: 47-54.
- Balaban R S, Nemoto S, Finkel T. 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120: 483-495.
- Balakier H. 1993. Fertilization and early embryology: Trippronuclear human zygotes: the first cell cycle and subsequent development. *Human Reproduction* 8: 1892-1897.

- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M, Forti G. 2000. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Frontiers in Bioscience* 5: E110-E123.
- Baltz J M. 2013. Connections between preimplantation embryo physiology and culture. *J Assist Reprod Genet* 30: 1001-1007.
- Baltz J M, Tartia A P. 2010. Cell volume regulation in oocytes and early embryos: connecting physiology to successful culture media. *Human Reproduction Update* 16: 166-176.
- Ball G D, Leibfried M L, Ax R L, First N L. 1984. Maturation and fertilization of bovine oocytes in vitro. *Journal of Dairy Science* 67: 2775-2785.
- Ball G D, Leibfried M L, Lenz R W, Ax R L, Bavister B D, First N L. 1983. Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol Reprod* 28: 717-725.
- Bansal A K, Bilaspuri G S. 2011. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int* 2011: 1-7.
- Barcelo-Fimbres M, Campos-Chillon L F, Seidel G E, Jr. 2011. In vitro fertilization using non-sexed and sexed bovine sperm: sperm concentration, sorter pressure, and bull effects. *Reproduction in Domestic Animals* 46: 495-502.
- Barnes F, Eyestone W. 1990. Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. *Theriogenology* 33: 141-152.
- Barnes F L, Sirard M A. 2000. Oocyte maturation. *Semin Reprod Med* 18: 123-131.
- Barnett D K, Bavister B D. 1996. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Molecular Reproduction and Development* 43: 105-133.
- Basile N, Meseguer M. 2012. Time-lapse technology: evaluation of embryo quality and new markers for embryo selection. *Expert Review of Obstetrics & Gynecology* 7: 175-190.
- Baumann C G, Morris D G, Sreenan J M, Leese H J. 2007. The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. *Molecular Reproduction and Development* 74: 1345-1353.
- Bavister B D. 1981. Analysis of Culture Media for In Vitro Fertilization and Criteria for Success. *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*. In: Mastroianni L, Biggers J D (Eds.). Springer US. Boston, MA. pp. 41-60.
- Bavister B D. 1988. Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro. *Theriogenology* 29: 143-154.
- Bavister B D. 1992. Co-culture for embryo development: is it really necessary? *Human Reproduction* 7: 1339-1341.
- Bavister B D. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reproduction Update* 1: 91-148.
- Bavister B D. 2000. Interactions between embryos and the culture milieu. *Theriogenology* 53: 619-626.
- Bavister B D. 2002. Early history of in vitro fertilization. *Reproduction* 124: 181-196.
- Bavister B D, 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.
- Beam S W, Butler W R. 1999. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 54: 411-424.
- Bedford J M. 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol Reprod* 2: 128-158.
- Bedford J M. 2004. Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biological Reviews* 79: 429-460.
- Bedford J M. 2011. Site of the mammalian sperm physiological acrosome reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 4703-4704.
- Beebe D, Wheeler M, Zeringue H, Walters E, Raty S. 2002. Microfluidic technology for assisted reproduction. *Theriogenology* 57: 125-135.

- Behboodi E, Anderson G B, BonDurant R H, Cargill S L, Kreuzer B R, Medrano J F, Murray J D. 1995. Birth of large calves that developed from in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 44: 227-232.
- Behrman H R, Kodaman P H, Preston S L, Gao S. 2001. Oxidative stress and the ovary. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 8: S40-S42.
- Bell M, Wang R, Hellstrom W J, Sikka S C. 1993. Effect of cryoprotective additives and cryopreservation protocol on sperm membrane lipid peroxidation and recovery of motile human sperm. *J Androl* 14: 472-478.
- Berger T, Marrs R P, Moyer D L. 1985. Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. *Fertil Steril* 43: 268-273.
- Bergh C. 1999. Recombinant follicle stimulating hormone. *Human Reproduction* 14: 1418-1420.
- Berglund B. 2008. Genetic Improvement of Dairy Cow Reproductive Performance. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 89-95.
- Berkkanoglu M, Isikoglu M, Aydin D, Ozgur K. 2007. Clinical effects of ovulation induction with recombinant follicle-stimulating hormone supplemented with recombinant luteinizing hormone or low-dose recombinant human chorionic gonadotropin in the midfollicular phase in microdose cycles in poor responders. *Fertil Steril* 88: 665-669.
- Berland M, Frei M, Peralta O, Ratto M. 2011. Time exposure period of bovine oocytes to sperm in relation to embryo development rate and quality. *ISRN Vet Sci* 2011: 1-4.
- Bermejo-Alvarez P, Lonergan P, Rath D, Gutierrez-Adan A, Rizos D. 2010a. Developmental kinetics and gene expression in male and female bovine embryos produced in vitro with sex-sorted spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development* 22: 426-436.
- Bermejo-Alvarez P, Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A. 2010b. Low oxygen tension during IVM improves bovine oocyte competence and enhances anaerobic glycolysis. *Reprod Biomed Online* 20: 341-349.
- Bermejo-Alvarez P, Rizos D, Rath D, Lonergan P, Gutierrez-Adan A. 2008. Can bovine in vitro-matured oocytes selectively process X- or Y-sorted sperm differentially? *Biol Reprod* 79: 594-597.
- Berndson W, Desjardins C. 1974. The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. *American Journal of Anatomy* 140: 167-179.
- Besenfelder U, Havlicek V, Brem G. 2012. Role of the oviduct in early embryo development. *Reproduction in Domestic Animals* 47: 156-163.
- Besenfelder U, Mossbacher G, Brem G. 2000. Oocyte collection. *Reproduction in Domestic Animals* 35: 38-44.
- Bettgowda A, Smith G W. 2007. Mechanisms of maternal mRNA regulation: implications for mammalian early embryonic development. *Frontiers in Bioscience* 12: 3713-3726.
- Betteridge K J. 2006. Farm animal embryo technologies: achievements and perspectives. *Theriogenology* 65: 905-913.
- Bervers M M, Dieleman S J, van den Hurk R, Izadyar F. 1997. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology* 47: 13-22.
- Bewley J, Schutz M. 2008. Review: an interdisciplinary review of body condition scoring for dairy cattle. *The Professional Animal Scientist* 24: 507-529.
- Beydola T, Sharma R K, Lee W, Agarwal A. 2013. Sperm preparation and selection techniques. *Male Infertility Practice*: 244-251.
- Biggers J D. 1987. Pioneering Mammalian Embryo Culture. *The Mammalian Preimplantation Embryo: Regulation of Growth and Differentiation in Vitro*. In: Bavister B D (Ed.). Springer US. Boston, MA. pp. 1-22.
- Biggers J D. 2002. Thoughts on embryo culture conditions. *Reprod Biomed Online* 4: 30-38.
- Biggers J D. 2004. Reflections on the culture of the preimplantation embryo. *International Journal of Developmental Biology* 42: 879-884.

Biggers J D, Borland R M. 1976. Physiological aspects of growth and development of the preimplantation mammalian embryo. *Annual Review of Physiology* 38: 95-119.

Biggers J D, McGinnis L K, Lawitts J A. 2005. One-step versus two-step culture of mouse preimplantation embryos: is there a difference? *Human Reproduction* 20: 3376-3384.

Biggers J D, McGinnis L K, Raffin M. 2000. Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium. *Biol Reprod* 63: 281-293.

Biggers J D, Stern S. 1973. Metabolism of the preimplantation mammalian embryo. *Adv Reprod Physiol* 6: 1-59.

Biggers J D, Summers M C. 2008. Choosing a culture medium: making informed choices. *Fertil Steril* 90: 473-483.

Biggers J D, Summers M C, McGinnis L K. 1997. Polyvinyl alcohol and amino acids as substitutes for bovine serum albumin in culture media for mouse preimplantation embryos. *Human Reproduction Update* 3: 125-135.

Bilodeau-Goeseels S. 2008. Review: The regulation of meiotic maturation in bovine oocytes. *Canadian Journal of Animal Science* 88: 343-349.

Bilodeau-Goeseels S. 2011. Cows are not mice: the role of cyclic AMP, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 78: 734-743.

Bilodeau-Goeseels S. 2012. Bovine oocyte meiotic inhibition before in vitro maturation and its value to in vitro embryo production: does it improve developmental competence? *Reproduction in Domestic Animals* 47: 687-693.

Bilodeau-Goeseels S, Magyara N. 2012. The Control of Meiotic Arrest and Resumption in Mammalian Oocytes. *Meiosis - Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity*. In: Swan A (Ed.). InTech. Rijeka, Croatia. pp. 151-172.

Bilodeau-Goeseels S, Panich P. 2002. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Animal Reproduction Science* 71: 143-155.

Bilodeau J F, Blanchette S, Gagnon C, Sirard M A. 2001. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology* 56: 275-286.

Bird J M, Carey S, Houghton J A. 1989. Motility and acrosomal changes in ionophore-treated bovine spermatozoa and their relationship with in vitro penetration of zone-free hamster oocytes. *Theriogenology* 32: 227-242.

Blecher S R, Howie R, Li S, Detmar J, Blahut L M. 1999. A new approach to immunological sexing of sperm. *Theriogenology* 52: 1309-1321.

Blondin P, Beaulieu M, Fournier V, Morin N, Crawford L, Madan P, King W A. 2009. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology* 71: 30-38.

Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard M A. 2002. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod* 66: 38-43.

Blondin P, Coenen K, Guilbault L A, Sirard M A. 1997a. In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology* 47: 1061-1075.

Blondin P, Guilbault L A, Sirard M A. 1995. In vitro production of bovine embryos: Developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology* 43: 168.

Blondin P, Guilbault L A, Sirard M A. 1997b. The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. *Theriogenology* 48: 803-813.

Blondin P, Sirard M A. 1994. The influence of the number of cumulus oocyte complexes cultured in-vitro on the developmental competence of bovine embryos. *Biol Reprod*. Vol. 50. Society for the Study of Reproduction (SSR). pp. 146-146.

Blondin P, Sirard M A. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 41: 54-62.

Bó G A, Mapletoft R J. 2014. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology* 81: 38-48.

- Boatman D E, Robbins R S. 1991. Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. *Biol Reprod* 44: 806-813.
- Boediono A, Rajamahendran R, Saha S, Sumantri C, Suzuki T. 1995. Effect of the presence of a CL in the ovary on oocyte number, cleavage rate and blastocyst production in vitro in cattle. *Theriogenology* 43: 169.
- Boland M, Lonergan P, O'Callaghan D. 2001. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology* 55: 1323-1340.
- Boland M P. 1984. Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology* 21: 126-137.
- Bols P E. 2005. Puncture of immature ovarian follicles in bovine assisted reproduction. *Verh K Acad Geneeskd Belg* 67: 177-202.
- Bols P E, Van Soom A, Ysebaert M T, Vandenheede J M, de Kruif A. 1996. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology* 45: 1001-1014.
- Bols P E, Vandenheede J M, Van Soom A, de Kruif A. 1995. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: A new disposable needle guidance system. *Theriogenology* 43: 677-687.
- Bols P E, Ysebaert M T, Van Soom A, de Kruif A. 1997. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology* 47: 1221-1236.
- Bolton V N, Braude P R. 1984. Preparation of human spermatozoa for in vitro fertilization by isopycnic centrifugation on self-generating density gradients. *Arch Androl* 13: 167-176.
- Bongso A, Ng S C, Fong C Y, Ratnam S. 1991. Cocultures: a new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. *Fertil Steril* 56: 179-191.
- Bongso A, Ng S C, Ratnam S. 1990. Co-cultures: their relevance to assisted reproduction. *Human Reproduction* 5: 893-900.
- Boni R, Tosti E, Roviello S, Dale B. 1999. Intercellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. *Biol Reprod* 61: 1050-1055.
- Boquest A C, Abeydeera L R, Wang W H, Day B N. 1999. Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos in vitro. *Theriogenology* 51: 1311-1319.
- Bormann C, Cabrera L, Heo Y S, Takayama S, Smith G. 2007. Dynamic microfluidic embryo culture enhances blastocyst development of murine and bovine embryos. *Biol Reprod* 77: 89-90.
- Botros L, Sakkas D, Seli E. 2008. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Mol Hum Reprod* 14: 679-690.
- Brackett B G. 1973. Mammalian fertilization in vitro. *Fed Proc* 32: 2065-2068.
- Brackett B G. 1981. In Vitro Culture of the Zygote and Embryo. *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*. In: Mastroianni L, Biggers J D (Eds.). Springer US. Boston, MA. pp. 61-79.
- Brackett B G. 1985. In vitro oocyte maturation and fertilization. *Journal of Animal Science* 61: 14-24.
- Brackett B G, Bousquet D, Boice M L, Donawick W J, Evans J F, Dressel M A. 1982. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod* 27: 147-158.
- Brackett B G, Oh Y K, Evans J F, Donawick W J. 1978. In vitro fertilization of cow ova. *Theriogenology* 9: 89.
- Brackett B G, Oh Y K, Evans J F, Donawick W J. 1980. Fertilization and early development of cow ova. *Biol Reprod* 23: 189-205.
- Brackett B G, Oliphant G. 1975a. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 12: 260-274.
- Brackett B G, Oliphant G. 1975b. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 12: 260-274.
- Brand A, Trounson A, Aarts M, Drost M, Zaayer D. 1978. Superovulation and non-surgical embryo recovery in the lactating dairy cow. *Animal Production* 26: 55-60.

Breining E, Cetica P D, Beconi M T. 2010. Capacitation inducers act through diverse intracellular mechanisms in cryopreserved bovine sperm. *Theriogenology* 74: 1036-1049.

Breitbart H. 2002. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol Cell Endocrinol* 187: 139-144.

Breitbart H, Cohen G, Rubinstein S. 2005. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction* 129: 263-268.

Breitbart H, Naor Z. 1999. Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Rev Reprod* 4: 151-159.

Breitbart H, Spungin B. 1997. The biochemistry of the acrosome reaction. *Mol Hum Reprod* 3: 195-202.

Brewis I A, Van Gestel R A, Gadella B M, Jones R, Publicover S J, Roldan E R, Frayne J, Barratt C L. 2005. The spermatozoon at fertilisation: current understanding and future research directions. *Hum Fertil (Camb)* 8: 241-251.

Brinster R L. 1968. In vitro Culture of Mammalian Embryos. *Journal of Animal Science* 27: 1-14.

Bruynzeel A, Merton J, Vd Wijst J, Hazeleger W, Kemp B. 1997. Effect of cumulus cells during IVM on bovine early embryonic development. *Theriogenology* 1: 185.

Bulfield G. 2000. Farm animal biotechnology. *Trends Biotechnol* 18: 10-13.

Butler S T. 2013. Genetic control of reproduction in dairy cows. *Reproduction, Fertility and Development* 26: 1-11.

Butler S T, Hutchinson I A, Cromie A R, Shalloo L. 2014. Applications and cost benefits of sexed semen in pasture-based dairy production systems. *Animal* 8: 165-172.

Butler W R. 1998. Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 81: 2533-2539.

Butler W R. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Animal Reproduction Science* 60-61: 449-457.

Butler W R. 2003. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock Production Science* 83: 211-218.

Byrd W. 1981. In vitro capacitation and the chemically induced acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology* 215: 35-46.

Caamaño J N, Ryoo Z Y, Youngs C R. 1998. Promotion of development of bovine embryos produced in vitro by addition of cysteine and β -mercaptoethanol to a chemically defined culture system. *Journal of Dairy Science* 81: 369-374.

Cagnone G, Sirard M A. 2014. The impact of exposure to serum lipids during in vitro culture on the transcriptome of bovine blastocysts. *Theriogenology* 81: 712-722.

Calder M D, Caveney A N, Sirard M A, Watson A J. 2005. Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation in vitro. *Fertil Steril* 83: 1077-1085.

Calder M D, Caveney A N, Smith L C, Watson A J. 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: 1-12.

Callesen H, Greve T, Christensen F. 1987. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 27: 217.

Camargo L, Viana J, Sá W, Ferreira A, Ramos A, Vale Filho V. 2006. Factors influencing in vitro embryo production. *Animal Reproduction* 3: 19-28.

Camargo L S A, Freitas C, de Sa W F, de Moraes Ferreira A, Serapiao R V, Viana J H M. 2010. Gestation length, birth weight and offspring gender ratio of in vitro-produced Gyr (*Bos indicus*) cattle embryos. *Animal Reproduction Science* 120: 10-15.

Camp T A, Rahal J O, Mayo K E. 1991. Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Mol Endocrinol* 5: 1405-1417.

Campbell K H, Wilmut I. 1997. Totipotency or multipotentiality of cultured cells: applications and progress. *Theriogenology* 47: 63-72.

Canipari R. 2000. Oocyte--granulosa cell interactions. *Human Reproduction Update* 6: 279-289.

Canovas S, Romar R, Grullon L A, Aviles M, Coy P. 2009. Pre-fertilization zona pellucida hardening by different cross-linkers affects IVF in pigs and cattle and improves embryo production in pigs. *Reproduction* 137: 803-812.

Cantone I, Fisher A G. 2013. Epigenetic programming and reprogramming during development. *Nature Structural & Molecular Biology* 20: 282-289.

Carolan C, Lonergan P, Khatir H, Mermillod P. 1996. In vitro production of bovine embryos using individual oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 45: 145-150.

Carolan C, Lonergan P, Van Langendonck A, Mermillod P. 1995. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology* 43: 1115-1128.

Carolan C, Monaghan P, Gallagher M, Gordon I. 1994. Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture in vitro. *Theriogenology* 41: 1061-1068.

Carrocera S, Caamaño J N, Trigo B, Martín D, Díez C. 2016. Developmental kinetics of in vitro-produced bovine embryos: An aid for making decisions. *Theriogenology* 85: 822-827.

Carter J A, Bellow S, Meintjes M, Perez O, Ferguson E, Godke R A. 2002. Transvaginal ultrasound-guided oocyte aspiration for production of embryos in vitro. *Archives Animal Breeding* 45: 99-108.

Carvalho J O, Sartori R, Machado G M, Mourao G B, Dode M A. 2010. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. *Theriogenology* 74: 1521-1530.

Catt J W. 1994. Bovine embryo co-culture. *Cell Biol Int* 18: 1155-1162.

Cebrian-Serrano A, Salvador I, Garcia-Rosello E, Pericuesta E, Perez-Cerezales S, Gutierrez-Adan A, Coy P, Silvestre M A. 2013. Effect of the bovine oviductal fluid on in vitro fertilization, development and gene expression of in vitro-produced bovine blastocysts. *Reproduction in Domestic Animals* 48: 331-338.

Centola G M, Herko R, Andolina E, Weisensel S. 1998. Comparison of sperm separation methods: effect on recovery, motility, motion parameters, and hyperactivation. *Fertil Steril* 70: 1173-1175.

Cerri R L, Juchem S O, Chebel R C, Rutigliano H M, Bruno R G, Galvao K N, Thatcher W W, Santos J E. 2009. Effect of fat source differing in fatty acid profile on metabolic parameters, fertilization, and embryo quality in high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science* 92: 1520-1531.

Cesari A, Kaiser G G, Mucci N, Mutto A, Vincenti A, Fornés M W, Alberio R H. 2006. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. *Theriogenology* 66: 1185-1193.

Cetica P D, Pintos L N, Dalvit G C, Beconi M T. 2001. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *IUBMB Life* 51: 57-64.

Ciapa B, Chiri S. 2000. Egg activation: upstream of the fertilization calcium signal. *Biology of the Cell* 92: 215-233.

Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, Kane J J, Jerry J, Blackwell C, de Leon F A P, Robl J M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280: 1256-1258.

Claassens O E, Menkveld R, Harrison K L. 1998. Evaluation of three substitutes for Percoll in sperm isolation by density gradient centrifugation. *Human Reproduction* 13: 3139-3143.

Clift D, Schuh M. 2013. Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14: 549-562.

- Cohen J, Rieger D. 2012. Historical Background of Gamete and Embryo Culture. Embryo Culture: Methods and Protocols. In: Smith G D, Swain J E, Pool T B (Eds.). Humana Press. Totowa, NJ. pp. 1-18.
- Cohen P E, Holloway J K. 2015. Mammalian Meiosis. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. In: Plant T M, Zeleznik A J (Eds.). Academic Press. San Diego. pp. 5-57.
- Collado-Fernandez E, Picton H M, Dumollard R. 2012. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. *International Journal of Developmental Biology* 56: 799-808.
- Collas P, Poccia D. 1998. Remodeling the sperm nucleus into a male pronucleus at fertilization. *Theriogenology* 49: 67-81.
- Collier R J, Dahl G E, VanBaale M J. 2006. Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 89: 1244-1253.
- Combelles C M, Cekleniak N A, Racowsky C, Albertini D F. 2002. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. *Human Reproduction* 17: 1006-1016.
- Combelles C M, Gupta S, Agarwal A. 2009. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? *Reprod Biomed Online* 18: 864-880.
- Combelles C M H, Hennet M L. 2012. Media Composition: Antioxidants/Chelators and Cellular Function. Embryo Culture: Methods and Protocols. In: Smith D G, Swain E J, Pool B T (Eds.). Humana Press. Totowa, NJ. pp. 129-159.
- Conti M, Hsieh M, Zamah A M, Oh J S. 2012. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol Cell Endocrinol* 356: 65-73.
- Cordova A, Perreau C, Uzbekova S, Ponsart C, Locatelli Y, Mermillod P. 2014. Development rate and gene expression of IVP bovine embryos cocultured with bovine oviduct epithelial cells at early or late stage of preimplantation development. *Theriogenology* 81: 1163-1173.
- Correa J R, Zavos P M. 1996. Preparation and recovery of frozen-thawed bovine spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies. *Theriogenology* 46: 1225-1232.
- Coscioni A C, Reichenbach H D, Schwartz J, LaFalci V S, Rodrigues J L, Brandelli A. 2001. Sperm function and production of bovine embryos in vitro after swim-up with different calcium and caffeine concentration. *Animal Reproduction Science* 67: 59-67.
- Costello S, Michelangeli F, Nash K, Lefievre L, Morris J, Machado-Oliveira G, Barratt C, Kirkman-Brown J, Publicover S. 2009. Ca²⁺-stores in sperm: their identities and functions. *Reproduction* 138: 425-437.
- Coy P, Aviles M. 2010. What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte? *Biol Rev Camb Philos Soc* 85: 593-605.
- Coy P, Canovas S, Mondejar I, Saavedra M D, Romar R, Grullon L, Matas C, Aviles M. 2008a. Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 15809-15814.
- Coy P, Gadea J, Romar R, Matas C, Garcia 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.
- Coy P, García-Vázquez F A, Visconti P E, Avilés M. 2012. Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction* 144: 649-660.
- Coy P, Grullon L, Canovas S, Romar R, Matas C, Aviles M. 2008b. Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. *Reproduction* 135: 19-27.
- Coy P, Romar R. 2002. In vitro production of pig embryos: a point of view. *Reproduction, Fertility and Development* 14: 275-286.
- Coy P, Romar R, Payton R R, McCann L, Saxton A M, Edwards J L. 2005. Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes using the S-enantiomer of roscovitine: effects on maturation, fertilization and subsequent embryo development in vitro. *Reproduction* 129: 19-26.

- Coy P, Yanagimachi R. 2015. The Common and Species-Specific Roles of Oviductal Proteins in Mammalian Fertilization and Embryo Development. *BioScience* 65: 973-984.
- Cran D, Cochrane D, Johnson L, Wei H, Lu K, Polge C. 1994. Separation of X-and Y-chromosome bearing bovine sperm by flow cytometry for use in IVF. *Theriogenology* 41: 183.
- Cran D G. 2007. XY sperm separation and use in artificial insemination and other ARTs. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65: 475-491.
- Crocco M C, Kelmansky D M, Mariano M I. 2013. Does serum cause lipid-droplet accumulation in bovine embryos produced in vitro, during developmental days 1 to 4? *J Assist Reprod Genet* 30: 1377-1388.
- Crosby I M, Gandolfi F, Moor R M. 1988. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 82: 769-775.
- Crosier A E, Farin P W, Dykstra M J, Alexander J E, Farin C E. 2000. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced in vivo or in vitro. *Biol Reprod* 62: 1459-1465.
- Crosier A E, Farin P W, Dykstra M J, Alexander J E, Farin C E. 2001. Ultrastructural Morphometry of Bovine Blastocysts Produced In Vivo or In Vitro. *Biol Reprod* 64: 1375-1385.
- Cummins J. 2009. Sperm motility and energetics. *Sperm Biology*. In: Birkhead T R, David J Hosken D J, Pitnick S (Eds.). Academic Press. London. pp. 185-206.
- Cummins J M. 2000. Fertilization and elimination of the paternal mitochondrial genome. *Human Reproduction* 15: 92-101.
- Cunningham E P. 1999. The application of biotechnologies to enhance animal production in different farming systems. *Livestock Production Science* 58: 1-24.
- Chandler J E, Wilson M P, Canal A M, Steinholt-Chenevert H. 1999. Bovine spermatozoal head size variation and evaluation of a separation technique based on this size. *Theriogenology* 52: 1021-1034.
- Chang H, Suarez S S. 2010. Rethinking the relationship between hyperactivation and chemotaxis in mammalian sperm. *Biol Reprod* 83: 507-513.
- Chang M C. 1951. Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes. *Nature* 168: 697-698.
- Chang M C. 1959. Fertilization of Rabbit Ova in vitro. *Nature* 184: 466-467.
- Chang M C. 1984. The Meaning of Sperm Capacitation A Historical Perspective. *J Androl* 5: 45-50.
- Chang M C, Marden W G R. 1954. The aerial transport of fertilized mammalian ova. *Journal of Heredity* 45: 75-78.
- Chanson A, Nocera D, Senn A, De Grandi P, Germond M. 2001. Development of a Well-Defined Medium for the In Vitro Maturation of Immature Bovine Cumulus-Oocyte Complexes. *J Assist Reprod Genet* 18: 97-105.
- Chatterjee S, Gagnon C. 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction and Development* 59: 451-458.
- Chaubal S A, Ferre L B, Molina J A, Faber D C, Bols P E, Rezamand P, Tian X, Yang X. 2007. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. *Theriogenology* 67: 719-728.
- Chaubal S A, Molina J A, Ohlrichs C L, Ferre L B, Faber D C, Bols P E, Riesen J W, Tian X, Yang X. 2006. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology* 65: 1631-1648.
- Chebel R C, Guagnini F S, Santos J E, Fetrow J P, Lima J R. 2010. Sex-sorted semen for dairy heifers: effects on reproductive and lactational performances. *Journal of Dairy Science* 93: 2496-2507.
- Checura C M, De la Torre Sanchez J F, Seidel G E, Jr. 2002. Developmental potential of oocytes from ovaries of cows vs. heifers. *Biol Reprod* 66: 150.

- Chen A A, Tan L, Suraj V, Pera R R, Shen S. 2013. Biomarkers identified with time-lapse imaging: discovery, validation, and practical application. *Fertil Steril* 99: 1035-1043.
- Chen L, Russell P T, Larsen W J. 1994. Sequential effects of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on mouse cumulus expansion in vitro. *Biol Reprod* 51: 290-295.
- Cheng C Y, Mruk D D. 2002. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiological Reviews* 82: 825-874.
- Chian R C, Nakahara H, Niwa K, Funahashi H. 1992. Fertilization and early cleavage in vitro of ageing bovine oocytes after maturation in culture. *Theriogenology* 37: 665-672.
- Chian R C, Niwa K, Sirard M A. 1994. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes in vitro. *Theriogenology* 41: 1499-1508.
- Chian R C, 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.
- Chian R C, Sirard M A, Tan S L. 1999. Recondensation of sperm nucleus during male pronuclear formation in bovine oocytes following in vitro fertilization: Light microscopic observation. *Theriogenology* 51: 315.
- Choi Y H, Carnevale E M, Seidel G E, Jr., Squire E L. 2001. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology* 56: 661-670.
- Choi Y H, Fukui Y, Ono H. 1991. Effects of media and the presence of bovine oviduct epithelial cells during in vitro fertilization on fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology* 36: 863-873.
- Chrenek P, Kubovicova E, Olexikova L, Makarevich A V, Toporcerova S, Ostro A. 2015. Effect of body condition and season on yield and quality of in vitro produced bovine embryos. *Zygote* 23: 893-899.
- Chronopoulou E, Harper J C. 2015. IVF culture media: past, present and future. *Human Reproduction Update* 21: 39-55.
- Chung J T, Tosca L, Huang T H, Xu L, Niwa K, Chian R C. 2007. Effect of polyvinylpyrrolidone on bovine oocyte maturation in vitro and subsequent fertilization and embryonic development. *Reprod Biomed Online* 15: 198-207.
- da Rocha A M, Smith G D. 2012. Culture systems: fluid dynamic embryo culture systems (microfluidics). *Methods Mol Biol* 912: 355-365.
- Dale B, DeFelice L. 2011. Polyspermy prevention: facts and artifacts? *J Assist Reprod Genet* 28: 199-207.
- Dalvit G, Llanes S P, Descalzo A, Insani M, Beconi M, Cetica P. 2005a. Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte in vitro maturation. *Reproduction in Domestic Animals* 40: 93-97.
- Dalvit G C, Cetica P D, Pintos L N, Beconi M T. 2005b. Reactive oxygen species in bovine embryo in vitro production. *Biocell* 29: 209-212.
- Dalvit G C, Miragaya M H, Chaves M G, Beconi M T. 1995. Energy requirement of bovine spermatozoa for in vitro capacitation. *Theriogenology* 44: 1051-1058.
- Damiani P, Fissore R A, Cibelli J B, Robl J M, Duby R T. 1995. Evaluation of cytoplasmic maturation of calf oocytes. *Theriogenology* 43: 191.
- Damiani P, Fissore R A, Duby R T. 1998. Biochemical and physiological maturation of cow and calf oocytes. *Theriogenology* 49: 310.
- Darszon A, Acevedo J J, Galindo B E, Hernandez-Gonzalez E O, Nishigaki T, Trevino C L, Wood C, Beltran C. 2006. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* 131: 977-988.
- Darszon A, Beltrán C, Felix R, Nishigaki T, Treviño C L. 2001. Ion transport in sperm signaling. *Dev Biol* 240: 1-14.
- Darszon A, Labarca P, Nishigaki T, Espinosa F. 1999. Ion channels in sperm physiology. *Physiological Reviews* 79: 481-510.
- Darszon A, Nishigaki T, Beltran C, Trevino C L. 2011. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological Reviews* 91: 1305-1355.

Darszon A, Nishigaki T, Wood C, Treviño C L, Felix R, Beltrán C. 2005. Calcium channels and Ca²⁺ fluctuations in sperm physiology. *International review of cytology* 243: 79-172.

Darszon A, Trevino C L, Wood C, Galindo B, Rodriguez-Miranda E, Acevedo J J, Hernandez-Gonzalez E O, Beltran C, Martinez-Lopez P, Nishigaki T. 2007. Ion channels in sperm motility and capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65: 229-244.

de Castro e Paula L A, Hansen P J. 2007. Interactions between oxygen tension and glucose concentration that modulate actions of heat shock on bovine oocytes during in vitro maturation. *Theriogenology* 68: 763-770.

De Jonge C J, Flaherty S P, Barnes A M, Swann N J, Matthews C D. 1997. Failure of multitube sperm swim-up for sex preselection. *Fertil Steril* 67: 1109-1114.

De La Fuente R. 2006. Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. *Dev Biol* 292: 1-12.

de Lamirande E, Gagnon C. 1994. Reactive oxygen species (ROS) and reproduction. *Adv Exp Med Biol* 366: 185-197.

de Lamirande E, Gagnon C. 1995. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Human Reproduction* 10: 15-21.

de Loos F, van Maurik P, van Beneden T, Kruip T A. 1992. Structural aspects of bovine oocyte maturation in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 31: 208-214.

de Loos F, van Vliet C, van Maurik P, Kruip T A. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res* 24: 197-204.

de Matos D G, Furnus C C. 2000. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 53: 761-771.

de Matos D G, Furnus C C, Moses D F. 1997. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol Reprod* 57: 1420-1425.

de Matos D G, Furnus C C, Moses D F, Baldassarre H. 1995. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 42: 432-436.

de Matos D G, Furnus C C, Moses D F, Martinez A G, Matkovic M. 1996. Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Molecular Reproduction and Development* 45: 451-457.

de Matos D G, Gasparrini B, Pasqualini S R, Thompson J G. 2002a. Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology* 57: 1443-1451.

de Matos D G, Herrera C, Cortvrindt R, Smitz J, Van Soom A, Nogueira D, Pasqualini R S. 2002b. Cysteamine supplementation during in vitro maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine in vitro embryo production. *Molecular Reproduction and Development* 62: 203-209.

De Moraes A, Hansen P J. 1997. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes development of in vitro produced bovine embryos. *Biol Reprod* 57: 1060-1065.

de Paz P, Sanchez A J, De la Fuente J, Chamorro C A, Alvarez M, Anel E, Anel L. 2001. Ultrastructural and cytochemical comparison between calf and cow oocytes. *Theriogenology* 55: 1107-1116.

de Rooij D G, Russell L D. 2000. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 21: 776-798.

De Roover R, Feugang J M, Bols P E, Genicot G, Hanzen C. 2008. Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle in vitro embryo production. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 239-245.

de Souza D K, Salles L P, Rosa e Silva A A. 2015. Aspects of energetic substrate metabolism of in vitro and in vivo bovine embryos. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 48: 191-197.

- De Vries A, Overton M, Fetrow J, Leslie K, Eicker S, Rogers G. 2008. Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. *Journal of Dairy Science* 91: 847-856.
- de Wit A A, Wurth Y A, Kruip T A. 2000. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *Journal of Animal Science* 78: 1277-1283.
- DeJarnette J M, Leach M A, Nebel R L, Marshall C E, McCleary C R, Moreno J F. 2011. Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible? *Journal of Dairy Science* 94: 3477-3483.
- DeJarnette J M, McCleary C R, Leach M A, Moreno J F, Nebel R L, Marshall C E. 2010. Effects of 2.1 and 3.5x10⁶ sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. *Journal of Dairy Science* 93: 4079-4085.
- DeJarnette J M, Nebel R L, Marshall C E. 2009. Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. *Theriogenology* 71: 49-58.
- DeJarnette J M, Nebel R L, Marshall C E, Moreno J F, McCleary C R, Lenz R W. 2008. Effect of sex-sorted sperm dosage on conception rates in Holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science* 91: 1778-1785.
- Del Corso A, Cappiello M, Mura U. 1994. Thiol dependent oxidation of enzymes: The last chance against oxidative stress. *International Journal of Biochemistry* 26: 745-750.
- Deleuze S, Goudet G. 2010. Cysteamine supplementation of in vitro maturation media: a review. *Reproduction in Domestic Animals* 45: e476-e482.
- Dell'Aqua J J A, Papa F O, Araújo J J P, Freitas C P, Ponchiroli C B, Figueiredo A S, Melo C M, Alberti K, Crespilho A M, Siqueira Filho E R, Orlandi C. 2006. The use of sexed semen on embryo production. *Acta Scientiae Veterinariae* 34: 205-212.
- Devreker F, Van den Bergh M, Biramane J, Winston R L, Englert Y, Hardy K. 1999. Effects of taurine on human embryo development in vitro. *Human Reproduction* 14: 2350-2356.
- Di Rienzo J A, Casanoves F, Balzarini M G, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C W. 2015: InfoStat. InfoStat Group, College of Agricultural Sciences, National University of Córdoba. 2015 edn. Córdoba, Argentina.
- Dias F C F, Khan M I R, Adams G P, Sirard M A, Singh J. 2014. Granulosa cell function and oocyte competence: Super-follicles, super-moms and super-stimulation in cattle. *Animal Reproduction Science* 149: 80-89.
- Dieleman S J, Hendriksen P J M, Viuff D, Thomsen P D, Hyttel P, Knijn H M, Wrenzycki C, Kruip T A M, Niemann H, Gadella B M, Bevers M M, Vos P L A M. 2002. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology* 57: 5-20.
- Dinnyes A, Lonergan P, Fair T, Boland M P, Yang X. 1999. Timing of the first cleavage post-insemination affects cryosurvival of in vitro-produced bovine blastocysts. *Molecular Reproduction and Development* 53: 318-324.
- Dirnfeld M, Bider D, Koifman M, Calderon I, Abramovici H. 1999. Shortened exposure of oocytes to spermatozoa improves in-vitro fertilization outcome: a prospective, randomized, controlled study. *Human Reproduction* 14: 2562-2564.
- Dode M A, Rodovalho N C, Ueno V G, Fernandes C E. 2002. The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of *Bos indicus* oocytes. *Animal Reproduction Science* 69: 15-23.
- Dominguez F, Gadea B, Mercader A, Esteban F J, Pellicer A, Simon C. 2010. Embryologic outcome and secretome profile of implanted blastocysts obtained after coculture in human endometrial epithelial cells versus the sequential system. *Fertil Steril* 93: 774-782.
- Dominguez M. 1995. Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. *Theriogenology* 43: 1405-1418.
- Donnay I, Partridge R J, Leese H J. 1999. Can embryo metabolism be used for selecting bovine embryos before transfer? *Reproduction Nutrition and Development* 39: 523-533.

- Donnay I, Van Langendonck A, Auquier P, Grisart B, Vansteenbrugge A, Massip A, Dessy F. 1997. Effects of co-culture and embryo number on the in vitro development of bovine embryos. *Theriogenology* 47: 1549-1561.
- Doree M. 1990. Control of M-phase by maturation-promoting factor. *Curr Opin Cell Biol* 2: 269-273.
- Downs S M. 2015. Nutrient pathways regulating the nuclear maturation of mammalian oocytes. *Reproduction, Fertility and Development* 27: 572-582.
- Dragileva E, Rubinstein S, Breitbart H. 1999. Intracellular Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase Regulates Calcium Influx and Acrosomal Exocytosis in Bull and Ram Spermatozoa. *Biol Reprod* 61: 1226-1234.
- Driancourt M A. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55: 1211-1239.
- du Plessis S S, Makker K, Desai N R, Agarwal A. 2008. Impact of oxidative stress on IVF. *Expert Review of Obstetrics & Gynecology* 3: 539-554.
- Duby R T, Damiani P, Looney C R, Fissore R A, Robl J M. 1996. Prepuberal calves as oocyte donors: Promises and problems. *Theriogenology* 45: 121-130.
- Duby R T, Damiani P, Looney C R, Long C R, Balise J J, Robl J M. 1995. Cytological characterization of maturation and fertilization in prepubertal calf oocytes. *Theriogenology* 43: 202-202.
- Ducibella T. 1996. The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Human Reproduction Update* 2: 29-42.
- Dunning K R, Russell D L, Robker R L. 2014. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. *Reproduction* 148: R15-R27.
- Duque P, Gomez E, Diaz E, Facal N, Hidalgo C, Diez C. 2003. Use of two replacements of serum during bovine embryo culture in vitro. *Theriogenology* 59: 889-899.
- Duranthon V, Renard J P. 2001. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology* 55: 1277-1289.
- Duranthon V, Watson A J, Lonergan P. 2008. Preimplantation embryo programming: transcription, epigenetics, and culture environment. *Reproduction* 135: 141-150.
- Durocher J, Morin N, Blondin P. 2006. Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation. *Theriogenology* 65: 102-115.
- Duszewska A, Reklewski Z, Pieńkowski M, Karasiewicz J, Modliński J. 2000. Development of bovine embryos on Vero/BRL cell monolayers (mixed co-culture). *Theriogenology* 54: 1239-1247.
- Ealy A D, Yang Q E. 2009. Control of interferon-tau expression during early pregnancy in ruminants. *Am J Reprod Immunol* 61: 95-106.
- Ebner T, Shebl O, Moser M, Mayer R B, Arzt W, Tews G. 2010. Group culture of human zygotes is superior to individual culture in terms of blastulation, implantation and life birth. *Reprod Biomed Online* 21: 762-768.
- Eckert J, Niemann H. 1995. In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. *Theriogenology* 43: 1211-1225.
- Eddy E M. 2006. The Spermatozoon. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. In: Neill J D, Plant T M, Pfaff D W, Challis J R G, de Kretser D M, Richards J S, Wassarman P M (Eds.). Academic Press. St Louis. pp. 3-54.
- Edmonson A, Lean I, Weaver L, Farver T, Webster G. 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 72: 68-78.
- Edwards J L, Hansen P J. 1997. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Molecular Reproduction and Development* 46: 138-145.
- Edwards L, Batt P, Williams D, Gardner D K. 1999. pH oscillations during bovine oocyte maturation. *Theriogenology* 51: 369.

Edwards L J, Batt P A, Gandolfi F, Gardner D K. 1997. Modifications made to culture medium by bovine oviduct epithelial cells: changes to carbohydrates stimulate bovine embryo development. *Molecular Reproduction and Development* 46: 146-154.

Edwards L J, Williams D A, Gardner D K. 1998. Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH. *Human Reproduction* 13: 3441-3448.

Edwards R G. 1965. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 208: 349-351.

Eisenbach M. 1999a. Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. *Dev Genet* 25: 87-94.

Eisenbach M. 1999b. Sperm chemotaxis. *Rev Reprod* 4: 56-66.

Eisenbach M, Giojalas L C. 2006. Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7: 276-285.

El-Raey M, Nagai T. 2014. Different aspects of cattle oocyte in vitro maturation: review. *Journal of Reproduction and Infertility* 5: 1-13.

Elder K, Dale B, Ménézo Y, Harper J, Huntriss J. 2010. Sperm-oocyte interaction. In-Vitro Fertilization. In: Elder K, Dale B (Eds.). Cambridge University Press. United States of America. pp. 50-63.

Elsden R P, Hasler J F, Seidel G E, Jr. 1976. Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology* 6: 523-532.

Ellington J E. 1991. The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of the literature. *Cornell Vet* 81: 313-328.

Enkhmaa D, Kasai T, Hoshi K. 2009. Long-time exposure of mouse embryos to the sperm produces high levels of reactive oxygen species in culture medium and relates to poor embryo development. *Reproduction in Domestic Animals* 44: 634-637.

Enright B P, Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Ward F A, Yang X, Boland M P. 2000. Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology* 54: 659-673.

Eppig J J. 1980. Regulation of cumulus oophorus expansion by gonadotropins in vivo and in vitro. *Biol Reprod* 23: 545-552.

Eppig J J. 1996. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reproduction, Fertility and Development* 8: 485-489.

Eppig J J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122: 829-838.

Eppig J J, Downs S M. 1984. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biol Reprod* 30: 1-11.

Eppig J J, Schultz R M, O'Brien M, Chesnel F. 1994. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 164: 1-9.

Eppig J J, Wigglesworth K. 1995. Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown in vitro: oxygen concentration. *Molecular Reproduction and Development* 42: 447-456.

Eppig J J, Wigglesworth K, Pendola F L. 2002. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 2890-2894.

Erickson B H. 1966a. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* 11: 97-105.

Erickson B H. 1966b. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science* 25: 800-805.

Evans J P. 2002. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Human Reproduction Update* 8: 297-311.

Evans J P. 2012. Sperm-Egg Interaction. *Annual Review of Physiology* 74: 477-502.

Eyestone W H, Leibfried-Rutledge M L, Northey D L, Gilligan B G, First N L. 1987. Culture of one- and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. *Theriogenology* 28: 1-7.

Faerge I, Mayes M, Hyttel P, Sirard M. 2001. Nuclear ultrastructure in bovine oocytes after inhibition of meiosis by chemical and biological inhibitors. *Molecular Reproduction and Development* 59: 459-467.

Fair T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science* 78: 203-216.

Fair T, Hulshof S C, Hyttel P, Greve T, Boland M. 1997. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anat Embryol (Berl)* 195: 327-336.

Fair T, Hyttel P, Greve T. 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular Reproduction and Development* 42: 437-442.

Fair T, Hyttel P, Greve T, Boland M. 1996. Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. *Molecular Reproduction and Development* 43: 503-512.

Fair T, Hyttel P, Lonergan P, Boland M P. 2001a. Immunolocalization of nucleolar proteins during bovine oocyte growth, meiotic maturation, and fertilization. *Biol Reprod* 64: 1516-1525.

Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, Cottell D C, Hyttel P, Ward F A, Boland M P. 2001b. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. *Molecular Reproduction and Development* 58: 186-195.

Fan H Y, Sun Q Y. 2004. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol Reprod* 70: 535-547.

Farin P, Britt J, Shaw D, Slenning B D. 1995. Agreement among evaluators of bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Theriogenology* 44: 339-349.

Farin P W, Crosier A E, Farin C E. 2001. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology* 55: 151-170.

Farin P W, Farin C E. 1995. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biol Reprod* 52: 676-682.

Farin P W, Piedrahita J A, Farin C E. 2006. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 65: 178-191.

Fatehi A N, Roelen B A, Colenbrander B, Schoevers E J, Gadella B M, Bevers M M, Van Den Hurk R. 2005. Presence of cumulus cells during in vitro fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. *Zygote* 13: 177-185.

Fawcett D W. 1975. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol* 44: 394-436.

Fazio R A, Hockett M E, Edwards J L, Rohrbach N R, Schrick F N. 1999. Effects of body condition and/or pregnancy status on developmental potential of bovine oocytes. *Theriogenology* 51: 223.

Fedoriw A, Mugford J, Magnuson T. 2012. Genomic imprinting and epigenetic control of development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: 1-16.

Ferguson E M, Leese H J. 1999. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 116: 373-378.

Ferguson E M, Leese H J. 2006. A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Molecular Reproduction and Development* 73: 1195-1201.

Ferré L, Ohlrichs C, Faber D. 2004. In vitro-derived embryo production with sexed and unsexed semen from different bulls. *Reproduction, Fertility and Development* 16: 253-253.

Ferré L B, Bogliotti Y, Chitwood J L, Fresno C, Ortega H H, Kjelland M E, Ross P J. 2016. Comparison of different fertilisation media for an in vitro maturation–fertilisation–culture system using flow-cytometrically sorted X chromosome-bearing spermatozoa for bovine embryo production. *Reproduction, Fertility and Development* 28: 1695-1703.

- Ferré L B, Bogliotti Y S, Chitwood J L, Ross P J. 2013. Effect of different fertilization media on in vitro bovine embryo development using flow-cytometrically-sorted female sperm. *Reproduction, Fertility and Development* 26: 203.
- Ferré L B, Dalla Lasta M, Medina M, Brogliatti G. 2002. In vitro embryo production and pregnancy rates from problem, pregnant and cyclic cows by transvaginal ovum pick-up. *Theriogenology* 57: 664.
- Ferreira E M, Vireque A A, Adona P R, Meirelles F V, Ferriani R A, Navarro P A. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 71: 836-848.
- Ferry L, Mermillod P, Massip A, Dessy F. 1994. Bovine embryos cultured in serum-poor oviduct-conditioned medium need cooperation to reach the blastocyst stage. *Theriogenology* 42: 445-453.
- Fiorentino A, Magli M C, Fortini D, Feliciani E, Ferraretti A P, Dale B, Gianaroli L. 1994. Sperm:oocyte ratios in an in vitro fertilization (IVF) program. *J Assist Reprod Genet* 11: 97-103.
- First N L, Parrish J J. 1987. In-vitro fertilization of ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility* 34: 151-165.
- Fischer B, Bavister B D. 1993. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility* 99: 673-679.
- Fissore R A, He C L, Vande Woude G F. 1996. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biol Reprod* 55: 1261-1270.
- Fissore R A, Kurokawa M, Knott J, Zhang M, Smyth J. 2002. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction* 124: 745-754.
- FitzHarris G, Baltz J M. 2009. Regulation of intracellular pH during oocyte growth and maturation in mammals. *Reproduction* 138: 619-627.
- Flaherty S P, Matthews C D. 1996. Application of modern molecular techniques to evaluate sperm sex selection methods. *Mol Hum Reprod* 2: 937-942.
- Fleming T P, Kwong W Y, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A, Miller D J, Watkins A J, Eckert J J. 2004. The embryo and its future. *Biol Reprod* 71: 1046-1054.
- Flood M R, Gage T, Bunch T. 1993. Effect of various growth-promoting factors on preimplantation bovine embryo development in vitro. *Theriogenology* 39: 823-833.
- Florman H M, Ducibella T. 2006. Mammalian Fertilization. *The physiology of reproduction*. In: Knobil E, Neill J D (Eds.). Elsevier Academic Press Publications. pp. 55-112.
- Florman H M, First N L. 1988. The regulation of acrosomal exocytosis: I. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucida in vitro. *Dev Biol* 128: 453-463.
- Florman H M, Fissore R A. 2015. Fertilization in Mammals. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. In: Plant T M, Zeleznik A J (Eds.). Academic Press. San Diego. pp. 149-196.
- Foote R H, Brockett C C, Kaproth M T. 2002. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal Reproduction Science* 71: 13-23.
- Ford W C. 2004. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Human Reproduction Update* 10: 387-399.
- Fortune J E, Rivera G M, Evans A C, Turzillo A M. 2001. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod* 65: 648-654.
- Fortune J E, Sirois J, Turzillo A M, Lavoie M. 1991. Follicle selection in domestic ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility* 43: 187-198.
- Fouladi-Nashta A A, Gutierrez C G, Gong J G, Garnsworthy P C, Webb R. 2007. Impact of Dietary Fatty Acids on Oocyte Quality and Development in Lactating Dairy Cows. *Biol Reprod* 77: 9-17.
- Fraser L R. 1995. Ionic control of sperm function. *Reproduction, Fertility and Development* 7: 905-925.
- Fraser L R. 1998. Sperm capacitation and the acrosome reaction. *Human Reproduction* 13: 9-19.

- Fraser L R. 2010. The “switching on” of mammalian spermatozoa: Molecular events involved in promotion and regulation of capacitation. *Molecular Reproduction and Development* 77: 197-208.
- Frijters A C J, Mullaart E, Roelofs R M G, van Hoorne R P, Moreno J F, Moreno O, Merton J S. 2009. What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process? *Theriogenology* 71: 64-67.
- Fry R C, Niall E M, Simpson T L, Squires T J, Reynolds J. 1997. The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology* 47: 977-987.
- Führer F, Mayr B, Schellander K, Kalat M, Schleger W. 1989. Maturation Competence and Chromatin Behaviour in Growing and Fully Grown Cattle Oocytes. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 36: 285-291.
- Fujii J, Iuchi Y, Okada F. 2005. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3: 1-10.
- Fujita T, Umeki H, Shimura H, Kugumiya K, Shiga K. 2006. Effect of group culture and embryo-culture conditioned medium on development of bovine embryos. *Journal of Reproduction and Development* 52: 137-142.
- Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K, Toyoda Y. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. *Biol Reprod* 42: 114-119.
- Fukui Y. 1990. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 26: 40-46.
- Fukui Y, Kikuchi Y, Kondo H, Mizushima S. 2000. Fertilizability and developmental capacity of individually cultured bovine oocytes. *Theriogenology* 53: 1553-1565.
- Fukui Y, McGowan L T, James R W, Pugh P A, Tervit H R. 1991. Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 92: 125-131.
- Fukui Y, Sonoyama T, Mochizuki H, Ono H. 1990. Effects of heparin dosage and sperm capacitation time on in vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 34: 579-591.
- Fulka J, Jr., First N L, Moor R M. 1998. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol Hum Reprod* 4: 41-49.
- Funahashi H. 2003. Polyspermic penetration in porcine IVM-IVF systems. *Reproduction, Fertility and Development* 15: 167-177.
- Furnus C C, de Matos D G, Moses D F. 1998. Cumulus expansion during in vitro maturation of bovine oocytes: relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent embryo development. *Molecular Reproduction and Development* 51: 76-83.
- Furnus C C, de Matos D G, Picco S, Garcia P P, Inda A M, Mattioli G, Errecalde A L. 2008. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during in vitro maturation of cattle oocytes. *Animal Reproduction Science* 109: 88-99.
- Gad A, Hoelker M, Besenfelder U, Havlicek V, Cinar U, Rings F, Held E, Dufort I, Sirard M A, Schellander K, Tesfaye D. 2012. Molecular mechanisms and pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative in vivo and in vitro culture conditions. *Biol Reprod* 87: 1-13.
- Gadella B M. 2008. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Animal Reproduction Science* 107: 229-236.
- Gadella B M. 2010. Interaction of sperm with the zona pellucida during fertilization. *Soc Reprod Fertil Suppl* 67: 267-287.
- Gadella B M, Evans J P. 2011. Membrane fusions during mammalian fertilization. *Adv Exp Med Biol* 713: 65-80.

- Gaffney E A, Gadêlha H, Smith D J, Blake J R, Kirkman-Brown J C. 2011. Mammalian Sperm Motility: Observation and Theory. *Annual Review of Fluid Mechanics* 43: 501-528.
- Galantino-Homer H L, Florman H M, Storey B T, Dobrinski I, Kopf G S. 2004. Bovine sperm capacitation: assessment of phosphodiesterase activity and intracellular alkalization on capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation. *Molecular Reproduction and Development* 67: 487-500.
- Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55: 1341-1357.
- Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. 2003. Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59: 599-616.
- Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. 2004. Production and quality of bovine oocytes and embryos. *Veterinary Research Communications* 28: 121-126.
- Galli C, Lazzari G. 1995. Granulosa cell supplementation during oocyte maturation improves the development of IVM-IVF bovine oocytes cultured in the sheep oviduct. *Theriogenology* 43: 216.
- Galli C, Lazzari G. 1996. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Animal Reproduction Science* 42: 371-379.
- Gandhi A P, Lane M, Gardner D K, Krisher R L. 2000. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Human Reproduction* 15: 395-401.
- Gandolfi F. 1994. Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. *Theriogenology* 41: 95-100.
- Gandolfi F. 1998. Embryonic development as a function of oocyte competence. *Serono Symposia*. Serono Symposia. pp. 337-353.
- Gandolfi F, Milanese E, Pocar P, Luciano A M, Brevini T A, Acocella F, Lauria A, Armstrong D T. 1998. Comparative analysis of calf and cow oocytes during in vitro maturation. *Molecular Reproduction and Development* 49: 168-175.
- Gandolfi F, Moor R M. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *Journal of Reproduction and Fertility* 81: 23-28.
- Gandolfi F, Vassena R, Lauria A. 2000. The developmental competence of the oocyte before puberty: Is something missing? *Reproduction in Domestic Animals* 35: 66-71.
- Gandolfi T A, Gandolfi F. 2001. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology* 55: 1255-1276.
- Gardner D, Lane M. 1997. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Human Reproduction Update* 3: 367-382.
- Gardner D K. 1994. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biol Int* 18: 1163-1179.
- Gardner D K. 1998. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology* 49: 83-102.
- Gardner D K. 2008. Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. *Reproduction, Fertility and Development* 20: 9-18.
- Gardner D K. 2015. Lactate production by the mammalian blastocyst: manipulating the microenvironment for uterine implantation and invasion? *Bioessays* 37: 364-371.
- Gardner D K, Harvey A J. 2015. Blastocyst metabolism. *Reproduction, Fertility and Development* 27: 638-654.
- Gardner D K, Lane M. 1993. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod* 48: 377-385.
- Gardner D K, Lane M. 1998. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Human Reproduction* 13: 148-159.

- Gardner D K, Lane M. 2002. Development of Viable Mammalian Embryos In Vitro: Evolution of Sequential Media. Principles of cloning. In: Cibelli J, Lanza R P, Campbell K H S, West M D (Eds.). Academic Press. San Diego, CA, USA. pp. 187-213.
- Gardner D K, Lane M. 2003. Towards a single embryo transfer. *Reprod Biomed Online* 6: 470-481.
- Gardner D K, Lane M. 2014a. Culture of Viable Mammalian Embryos In Vitro. Principles of cloning. In: Cibelli J, Gurdon J, Wilmut I, Jaenisch R, Lanza R, West M D, Campbell K H S (Eds.). Academic Press. San Diego. pp. 63-84.
- Gardner D K, Lane M. 2014b. Mammalian Preimplantation Embryo Culture. *Mouse Molecular Embryology: Methods and Protocols*. In: Lewandoski M (Ed.). Springer US. Boston, MA. pp. 167-182.
- Gardner D K, Lane M, Calderon I, Leeton J. 1996. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril* 65: 349-353.
- Gardner D K, Lane M, Schoolcraft W B. 2000a. Culture and transfer of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF. *Human Reproduction* 15: 9-23.
- Gardner D K, Lane M, Spitzer A, Batt P A. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol Reprod* 50: 390-400.
- Gardner D K, Lane M W, Lane M. 2000b. EDTA stimulates cleavage stage bovine embryo development in culture but inhibits blastocyst development and differentiation. *Molecular Reproduction and Development* 57: 256-261.
- Gardner D K, Pool T B, Lane M. 2000c. Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation, and viability. *Semin Reprod Med* 18: 205-218.
- Gardner D K, Wale P L, Collins R, Lane M. 2011. Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. *Human Reproduction* 26: 1981-1986.
- Garner D L. 2001. Sex-sorting mammalian sperm: concept to application in animals. *J Androl* 22: 519-526.
- Garner D L. 2006. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* 65: 943-957.
- Garner D L, Evans K M, Seidel G E, Jr. 2013. Sex-sorting sperm using flow cytometry/cell sorting. *Methods Mol Biol* 927: 279-295.
- Garner D L, Gledhill B L, Pinkel D, Lake S, Stephenson D, Van Dilla M A, Johnson L A. 1983. Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biol Reprod* 28: 312-321.
- Garner D L, Hafez E S E. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. *Reproduction in Farm Animals*. Lippincott Williams & Wilkins. pp. 96-109.
- Garner D L, Seidel G E, Jr. 2003. Past, present and future perspectives on sexing sperm. *Canadian Journal of Animal Science* 83: 375-384.
- Garner D L, Seidel G E, Jr. 2008. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology* 69: 886-895.
- Gawecka-Szczygiel M, Kurpisz M. 1995. X- and Y-chromosome-bearing sperm selection and detection methods. A review. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 33: 219-227.
- Ge Z-J, Schatten H, Zhang C-L, Sun Q-Y. 2015. Oocyte ageing and epigenetics. *Reproduction* 149: R103-R114.
- Geisert R D, Malayer J R. 2000. Implantation. *Reproduction in Farm Animals*. Lippincott Williams & Wilkins. pp. 126-139.
- Ghersevich S, Massa E, Zumoffen C. 2015. Oviductal secretion and gamete interaction. *Reproduction* 149: R1-R14.
- Ghetler Y, Yavin S, Shalgi R, Arav A. 2005. The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes. *Human Reproduction* 20: 3385-3389.

- Gianaroli L, Cristina Magli M, Ferraretti A P, Fiorentino A, Tosti E, Panzella S, Dale B. 1996a. Reducing the time of sperm-oocyte interaction in human in-vitro fertilization improves the implantation rate. *Human Reproduction* 11: 166-171.
- Gianaroli L, Fiorentino A, Magli M C, Ferraretti A P, Montanaro N. 1996b. Prolonged sperm-oocyte exposure and high sperm concentration affect human embryo viability and pregnancy rate. *Human Reproduction* 11: 2507-2511.
- Gil M A, Alminana C, Cuello C, Parrilla I, Roca J, Vazquez J M, Martinez E A. 2007. Brief coincubation of gametes in porcine in vitro fertilization: role of sperm:oocyte ratio and post-coincubation medium. *Theriogenology* 67: 620-626.
- Gil M A, Ruiz M, Vazquez J M, Roca J, Day B N, Martinez E A. 2004. Effect of short periods of sperm-oocyte coincubation during in vitro fertilization on embryo development in pigs. *Theriogenology* 62: 544-552.
- Gilchrist R B. 2010. Recent insights into oocyte–follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. *Reproduction, Fertility and Development* 23: 23-31.
- Gilchrist R B, Lane M, Thompson J G. 2008. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update* 14: 159-177.
- Gilchrist R B, Ritter L J, Armstrong D T. 2004. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal Reproduction Science* 82-83: 431-446.
- Gilchrist R B, Thompson J G. 2007. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology* 67: 6-15.
- Gilchrist R B, Zeng H T, Wang X, Richani D, Smitz J, Thompson J G. 2015. Reevaluation and evolution of the simulated physiological oocyte maturation system. *Theriogenology* 84: 656-657.
- Gilula N B, Fawcett D W, Aoki A. 1976. The Sertoli cell occluding junctions and gap junctions in mature and developing mammalian testis. *Dev Biol* 50: 142-168.
- Ginther O J. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Science* 60-61: 61-79.
- Ginther O J, Beg M A, Bergfelt D R, Donadeu F X, Kot K. 2001. Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod* 65: 638-647.
- Ginther O J, Bergfelt D R, Kulick L J, Kot K. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. *Biol Reprod* 62: 920-927.
- Ginther O J, Kastelic J P, Knopf L. 1989. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Animal Reproduction Science* 20: 187-200.
- Ginther O J, Kot K, Kulick L J, Wiltbank M C. 1997. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology* 48: 75-87.
- Gledhill B L. 1988. Selection and separation of X- and Y- chromosome-bearing mammalian sperm. *Gamete Res* 20: 377-395.
- Gliedt D W, Rosenkrans C F, Jr., Rorie R W, Munyon A L, Pierson J N, Miller G F, Rakes J M. 1996. Effects of media, serum, oviductal cells, and hormones during maturation on bovine embryo development in vitro. *Journal of Dairy Science* 79: 536-542.
- Gloria A, Carluccio A, Wegher L, Robbe D, Befaccia G, Contri A. 2016. Single and double layer centrifugation improve the quality of cryopreserved bovine sperm from poor quality ejaculates. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 7: 1-9.
- Goddard M E, Hayes B J. 2007. Genomic selection. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 124: 323-330.
- Goissis M D, Cibelli J B. 2014. Functional Characterization of SOX2 in Bovine Preimplantation Embryos. *Biol Reprod* 90: 1-10.
- Gomez E, Diez C. 2000. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development in vitro. *Animal Reproduction Science* 58: 23-37.

- Gomez E, Rodriguez A, Munoz M, Caamaño J N, Hidalgo C O, Moran E, Facal N, Diez C. 2008. Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology* 69: 1013-1021.
- Gopichandran N, Leese H J. 2003. Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid. *Reproduction* 126: 299-308.
- Gopichandran N, Leese H J. 2006. The effect of paracrine/autocrine interactions on the in vitro culture of bovine preimplantation embryos. *Reproduction* 131: 269-277.
- Gordo A C, He C L, Smith S, Fissore R A. 2001. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 59: 106-114.
- Gordon I. 2003a. The Bovine Oestrous Cycle and Associated Events. Laboratory production of cattle embryos. In: Gordon I (Ed.). CABI Publishing. Oxon, UK - Cambridge, MA, USA. pp. 42-78.
- Gordon I. 2003b. Capacitating Bovine Sperm. Laboratory production of cattle embryos. In: Gordon I (Ed.). CABI Publishing. Oxon, UK ; Cambridge, MA, USA. pp. 158-175.
- Gordon I. 2003c. Culturing and Evaluating the Early Bovine Embryo. Laboratory production of cattle embryos. In: Gordon I (Ed.). CABI Publishing. Oxon, UK ; Cambridge, MA, USA. pp. 220-276.
- Gordon I. 2003d. Developments in embryo in vitro production (IVP) technology. Laboratory production of cattle embryos. In: Gordon I (Ed.). CABI Publishing. Oxon, UK ; Cambridge, MA, USA. pp. 1-41.
- Gordon I. 2003e. In Vitro Fertilization. Laboratory production of cattle embryos. In: Gordon I (Ed.). CABI Publishing. Oxon, UK ; Cambridge, MA, USA. pp. 176-219.
- Gordon I. 2003f. Maturing the Bovine Oocyte. Laboratory production of cattle embryos. In: Gordon I (Ed.). CABI Publishing. Oxon, UK - Cambridge, MA, USA. pp. 112-157.
- Gordon I. 2003g. Recovering the Bovine Oocyte. Laboratory production of cattle embryos. In: Gordon I (Ed.). CABI Publishing. Oxon, UK - Cambridge, MA, USA. pp. 79-111.
- Gordon I. 2004. In Vitro Embryo Production. *Reproductive Technologies in Farm Animals*. In: Gordon I (Ed.). CABI Publishing. Oxon, UK ; Cambridge, MA, USA. pp. 108-138.
- Gordon I, Lu K H. 1990. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. *Theriogenology* 33: 77-87.
- Gosálvez J, Ramirez M A, López-Fernández C, Crespo F, Evans K M, Kjelland M E, Moreno J F. 2011a. Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features. *Theriogenology* 75: 197-205.
- Gosálvez J, Ramirez M A, López-Fernández C, Crespo F, Evans K M, Kjelland M E, Moreno J F. 2011b. Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: II. Dynamic features. *Theriogenology* 75: 206-211.
- Gosden R G. 2002. Oogenesis as a foundation for embryogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 186: 149-153.
- Goto K, Iwai N, Takuma Y, Nakanishi Y. 1992. Co-culture of in vitro fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *Journal of Animal Science* 70: 1449-1453.
- 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. *Journal of Reproduction and Fertility* 83: 753-758.
- Goud A P, Goud P T, Diamond M P, Gonik B, Abu-Soud H M. 2008. Reactive oxygen species and oocyte aging: role of superoxide, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine* 44: 1295-1304.
- Graham J K, Mocé E. 2005. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology* 64: 492-504.
- Gregory S J, Kaiser U B. 2004. Regulation of gonadotropins by inhibin and activin. *Semin Reprod Med* 22: 253-267.

- Greve T, Avery B, Callesen H. 1993. Viability of in-vivo and in-vitro produced bovine embryos. *Reproduction in Domestic Animals* 28: 164-169.
- Greve T, Lehn-Jensen H, Rasbech N. 1977. Non-surgical recovery of bovine embryos. *Theriogenology* 7: 239-250.
- Greve T, Madison V. 1991. In vitro fertilization in cattle: a review. *Reproduction Nutrition Development* 31: 147-157.
- Greve T, Xu K P, Callesen H, Hyttel P. 1987. In vivo development of in vitro fertilized bovine oocytes matured in vivo versus in vitro. *Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer* 4: 281-285.
- Grippio A A, Way A L, Killian G J. 1995. Effect of bovine ampullary and isthmic oviductal fluid on motility, acrosome reaction and fertility of bull spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 105: 57-64.
- Griswold M D. 1995. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol Reprod* 52: 211-216.
- Griveau J F, Le Lannou D. 1997. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 20: 61-69.
- Gruppen C, Nottle M. 2000. In vitro Fertilization-A simple modification of the in vitro fertilization procedure increases the efficiency of in vitro pig embryo production. *Theriogenology* 53: 422-422.
- Guerif F, McKeegan P, Leese H J, Sturmey R G. 2013. A simple approach for Consumption and Release (CORE) analysis of metabolic activity in single mammalian embryos. *PLoS One* 8: 1-9.
- Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update* 7: 175-189.
- Guimaraes A L, Pereira S A, Leme L O, Dode M A. 2015. Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation system for improving bovine in vitro embryo production. *Theriogenology* 83: 52-57.
- Gulyas B J, Yuan L C. 1985. Cortical reaction and zona hardening in mouse oocytes following exposure to ethanol. *Journal of Experimental Zoology* 233: 269-276.
- Guraya S S. 1987a. Head. *Biology of Spermatogenesis and Spermatozoa in Mammals*. In: Guraya S S (Ed.). Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg. pp. 187-247.
- Guraya S S. 1987b. Seminiferous Epithelium. *Biology of Spermatogenesis and Spermatozoa in Mammals*. In: Guraya S S (Ed.). Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg. pp. 7-54.
- Guraya S S. 1987c. Sperm Motility. *Biology of Spermatogenesis and Spermatozoa in Mammals*. In: Guraya S S (Ed.). Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg. pp. 338-360.
- Guraya S S. 1987d. Spermatids and Spermiogenesis. *Biology of Spermatogenesis and Spermatozoa in Mammals*. In: Guraya S S (Ed.). Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg. pp. 108-169.
- Guraya S S. 1987e. Spermatogonia. *Biology of Spermatogenesis and Spermatozoa in Mammals*. In: Guraya S S (Ed.). Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg. pp. 55-78.
- Guraya S S. 1987f. Tail. *Biology of Spermatogenesis and Spermatozoa in Mammals*. In: Guraya S S (Ed.). Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg. pp. 257-305.
- Gutierrez-Adan A, Granados J, Pintado B, De La Fuente J. 2001a. Influence of glucose on the sex ratio of bovine IVM/IVF embryos cultured in vitro. *Reproduction, Fertility and Development* 13: 361-365.
- Gutierrez-Adan A, Lonergan P, Rizos D, Ward F A, Boland M P, Pintado B, de la Fuente J. 2001b. Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 55: 1117-1126.
- Gutnisky C, Dalvit G C, Pintos L N, Thompson J G, Beconi M T, Cetica P D. 2007. Influence of hyaluronic acid synthesis and cumulus mucification on bovine oocyte in vitro maturation, fertilisation and embryo development. *Reproduction, Fertility and Development* 19: 488-497.

- Guyader-Joly C, Guérin P, Renard J P, Guillaud J, Ponchon S, Ménézo Y. 1998. Precursors of taurine in female genital tract: Effects on developmental capacity of bovine embryo produced in vitro. *Amino Acids* 15: 27-42.
- Gwazdauskas F C, Kendrick K W, Pryor A W, Bailey T L. 2000. Impact of follicular aspiration on folliculogenesis as influenced by dietary energy and stage of lactation. *Journal of Dairy Science* 83: 1625-1634.
- Hafez E S E, Hafez B. 2000a. Fertilization and Cleavage. *Reproduction in Farm Animals*. Lippincott Williams & Wilkins. pp. 110-125.
- Hafez E S E, Hafez B. 2000b. Transport and Survival of Gametes. *Reproduction in Farm Animals*. Lippincott Williams & Wilkins. pp. 82-95.
- Hagemann L J. 1999. Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. *Theriogenology* 51: 449-459.
- Hagemann L J, Weilert L L, Beaumont S E, Tervit H R. 1998. Development of bovine embryos in single in vitro production (sIVP) systems. *Molecular Reproduction and Development* 51: 143-147.
- Hall J B, Glaze J B. 2014. Review: System application of sexed semen in beef cattle. *The Professional Animal Scientist* 30: 279-284.
- Hamawaki A, Hamano S, Kuwayama M. 1995. Effect of methylated xanthine on sperm penetration of bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 43: 230.
- Hammond J, Jr. 1949. Recovery and culture of tubal mouse ova. *Nature* 163: 28.
- Han T L, Flaherty S P, Ford J H, Matthews C D. 1993. Detection of X- and Y-bearing human spermatozoa after motile sperm isolation by swim-up. *Fertil Steril* 60: 1046-1051.
- Hansen P J. 2006. Realizing the promise of IVF in cattle - An overview. *Theriogenology* 65: 119-125.
- Hansen P J. 2014. Current and Future Assisted Reproductive Technologies for Mammalian Farm Animals. *Current and Future Reproductive Technologies and World Food Production*. In: Lamb G C, DiLorenzo N (Eds.). Springer New York. pp. 1-22.
- Hansen P J, Block B J. 2004. Towards an embryocentric world: the current and potential uses of embryo technologies in dairy production. *Reproduction, Fertility and Development* 16: 1-14.
- Hansen P J, Block J, Loureiro B, Bonilla L, Hendricks K E. 2010. Effects of gamete source and culture conditions on the competence of in vitro-produced embryos for post-transfer survival in cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 22: 59-66.
- Harris S E, Gopichandran N, Picton H M, Leese H J, Orsi N M. 2005. Nutrient concentrations in murine follicular fluid and the female reproductive tract. *Theriogenology* 64: 992-1006.
- Harrison R. 1996. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reproduction, Fertility and Development* 8: 581-594.
- Harrison R O, Ford S P, Young J W, Conley A J, Freeman A E. 1990. Increased Milk Production Versus Reproductive and Energy Status of High Producing Dairy Cows¹. *Journal of Dairy Science* 73: 2749-2758.
- Harvey A J. 2007. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Animal Reproduction Science* 98: 113-128.
- Harvey A J, Kind K L, Thompson J G. 2002. REDOX regulation of early embryo development. *Reproduction* 123: 479-486.
- Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Yamada M, Imai H, Kashima N. 2000a. Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. *Molecular Reproduction and Development* 57: 353-360.
- Hashimoto S, Minami N, Yamada M, Imai H. 2000b. Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Molecular Reproduction and Development* 56: 520-526.

Hashimoto S, Saeki K, Nagao Y, Minami N, Yamada M, Utsumi K. 1998a. Effects of cumulus cell density during in vitro maturation of the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 49: 1451-1463.

Hashimoto S, Takakura R, Kishi M, Sudo T, Minami N, Yamada M. 1998b. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on the recovery rate of bovine cumulus-oocyte-complexes by transvaginal aspiration. *Theriogenology* 49: 401.

Hashimoto S, Takakura R, Kishi M, Sudo T, Minami N, Yamada M. 1999. Ultrasound-guided follicle aspiration: the collection of bovine cumulus-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. *Theriogenology* 51: 757-765.

Hasler J F. 2000. In vitro culture of bovine embryos in Menezes's B2 medium with or without coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. *Animal Reproduction Science* 60-61: 81-91.

Hasler J F. 2003. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Animal Reproduction Science* 79: 245-264.

Hasler J F. 2014. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology* 81: 152-169.

Hasler J F, Barfield J P. 2014. In Vitro Fertilization. *Bovine Reproduction*. John Wiley & Sons, Inc. pp. 758-770.

Hawk H W, Wall R J. 1994. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. II. Media and co-culture cells. *Theriogenology* 41: 1585-1594.

Hayakawa H, Hirai T, Takimoto A, Ideta A, Aoyagi Y. 2009. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology* 71: 68-73.

Hayes B J, Bowman P J, Chamberlain A J, Goddard M E. 2009. Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. *Journal of Dairy Science* 92: 433-443.

He C L, Damiani P, Parys J B, Fissore R A. 1997. Calcium, calcium release receptors, and meiotic resumption in bovine oocytes. *Biol Reprod* 57: 1245-1255.

Heeres A A, Merton J S, Hazeleger W, van Wagtenonk-de Leeuw A M, Kemp B. 1996. Optimization of sperm/oocyte ratio during in vitro fertilization of bovine cumulus-oocytes-complexes. *Theriogenology* 45: 266.

Hegde A, Behr B. 2012. Media Composition: Growth Factors. *Embryo Culture: Methods and Protocols*. In: Smith D G, Swain E J, Pool B T (Eds.). Humana Press. Totowa, NJ, USA. pp. 177-198.

Heikinheimo O, Gibbons W E. 1998. The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. *Mol Hum Reprod* 4: 745-756.

Hendriksen P J, Steenweg W N, Harkema J C, Merton J S, Bevers M M, Vos P L, Dieleman S J. 2004. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 61: 909-920.

Hendriksen P J, Vos P L, Steenweg W N, Bevers M M, Dieleman S J. 2000. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology* 53: 11-20.

Hendriksen P J M, Bevers M M, Dieleman S J. 1999. Single IVP using BRL cell co-culture and serum yields a lower blastocyst rate than group culture. *Theriogenology* 51: 319.

Henkel R R. 2012. Sperm preparation: state-of-the-art--physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian J Androl* 14: 260-269.

Henkel R R, Schill W B. 2003. Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1: 1-22.

Hernandez-Medrano J H, Campbell B K, Webb R. 2012. Nutritional Influences on Folliculogenesis. *Reproduction in Domestic Animals* 47: 274-282.

Hess R A, Franca L R. 2008. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. In: Cheng C Y (Ed.). Springer New York. New York, NY. pp. 1-15.

Hiendleder S, Wolf E. 2003. The mitochondrial genome in embryo technologies. *Reproduction in Domestic Animals* 38: 290-304.

Hillier S G. 1994. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Human Reproduction* 9: 188-191.

Hillier S G. 2009. Paracrine support of ovarian stimulation. *Mol Hum Reprod* 15: 843-850.

Hillier S G, Whitelaw P F, Smyth C D. 1994. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol* 100: 51-54.

Hirao Y. 2011. Conditions affecting growth and developmental competence of mammalian oocytes in vitro. *Animal Science Journal* 82: 187-197.

Ho H-C, Suarez S S. 2001a. An Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor-Gated Intracellular Ca²⁺ Store Is Involved in Regulating Sperm Hyperactivated Motility. *Biol Reprod* 65: 1606-1615.

Ho H C, Granish K A, Suarez S S. 2002. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca²⁺ and not cAMP. *Dev Biol* 250: 208-217.

Ho H C, Suarez S S. 2001b. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction* 122: 519-526.

Ho H C, Suarez S S. 2001c. An Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor-Gated Intracellular Ca²⁺ Store Is Involved in Regulating Sperm Hyperactivated Motility. *Biol Reprod* 65: 1606-1615.

Hochedlinger K, Jaenisch R. 2006. Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature* 441: 1061-1067.

Hoelker M, Rings F, Lund Q, Ghanem N, Phatsara C, Griese J, Schellander K, Tesfaye D. 2009. Effect of the microenvironment and embryo density on developmental characteristics and gene expression profile of bovine preimplantative embryos cultured in vitro. *Reproduction* 137: 415-425.

Hoelker M, Rings F, Lund Q, Phatsara C, Schellander K, Tesfaye D. 2010. Effect of embryo density on in vitro developmental characteristics of bovine preimplantative embryos with respect to micro and macroenvironments. *Reproduction in Domestic Animals* 45: e138-e145.

Hohenboken W D. 1999. Applications of sexed semen in cattle production. *Theriogenology* 52: 1421-1433.

Holm P, Booth P J, Callesen H. 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.

Holm P, Booth P J, Schmidt M H, Greve T, Callesen H. 1999. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 52: 683-700.

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.

Holm P, Shukri N N, Vajta G, Booth P, Bendixen C, Callesen H. 1998. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. *Theriogenology* 50: 1285-1299.

Holm P, Walker S K, Petersen B A, Ashman R J, Seamark R F. 1994. In vitro vs in vivo culture of ovine IVM-IVF ova: Effect on lambing. *Theriogenology* 41: 217.

Holt J E, Lane S I, Jones K T. 2013. The control of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Curr Top Dev Biol* 102: 207-226.

Hollinshead F K, Gillan L, O'Brien J K, Evans G, Maxwell W M C. 2003. In vitro and in vivo assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing. *Reproduction, Fertility and Development* 15: 351-359.

Homa S T. 1995. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Molecular Reproduction and Development* 40: 122-134.

Homa S T, Carroll J, Swann K. 1993. Fertilization and early embryology: The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Human Reproduction* 8: 1274-1281.

- Hoodbhoy T, Talbot P. 1994. Mammalian cortical granules: contents, fate, and function. *Molecular Reproduction and Development* 39: 439-448.
- Hori N, Matsuda T, Ishida M, Komae H, Nagai T. 1997. Effect of Hypotaourine in Fertilization Medium on Fertilization of In Vitro Matured Bovine Oocytes and Their Subsequent Development. *Journal of Reproduction and Development* 43: j33-j40.
- Horne R, Bishop C J, Reeves G, Wood C, Kovacs G T. 1996. Aspiration of oocytes for in-vitro fertilization. *Human Reproduction Update* 2: 77-85.
- Hoshi H. 2003. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology* 59: 675-685.
- Houghton F D. 2006. Energy metabolism of the inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. *Differentiation* 74: 11-18.
- Houghton F D. 2012. Media Composition: Amino Acids and Cellular Homeostasis. *Embryo Culture: Methods and Protocols*. In: Smith D G, Swain E J, Pool B T (Eds.). Humana Press. Totowa, NJ. pp. 97-106.
- Houghton F D, Hawkhead J A, Humpherson P G, Hogg J E, Balen A H, Rutherford A J, Leese H J. 2002. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Human Reproduction* 17: 999-1005.
- Howard D J, Palumbi S R, Birge L M, Manier M K. 2009. Sperm and speciation. *Sperm Biology*. In: Birkhead T R, David J Hosken D J, Pitnick S (Eds.). Academic Press. London. pp. 367-403.
- Howes E A, Miller N G, Dolby C, Hutchings A, Butcher G W, Jones R. 1997. A search for sex-specific antigens on bovine spermatozoa using immunological and biochemical techniques to compare the protein profiles of X and Y chromosome-bearing sperm populations separated by fluorescence-activated cell sorting. *Journal of Reproduction and Fertility* 110: 195-204.
- Howles C M. 2000. Role of LH and FSH in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol* 161: 25-30.
- Hu T-x, Zhu H-b, Sun W-j, Hao H-s, Zhao X-m, Du W-h, Wang Z-l. 2016. Sperm pretreatment with glutathione improves IVF embryos development through increasing the viability and antioxidative capacity of sex-sorted and unsorted bull semen. *Journal of Integrative Agriculture* 15: 2326-2335.
- Hugentobler S A, Humpherson P G, Leese H J, Sreenan J M, Morris D G. 2008. Energy substrates in bovine oviduct and uterine fluid and blood plasma during the oestrous cycle. *Molecular Reproduction and Development* 75: 496-503.
- Hugentobler S A, Sreenan J M, Humpherson P G, Leese H J, Diskin M G, Morris D G. 2010. Effects of changes in the concentration of systemic progesterone on ions, amino acids and energy substrates in cattle oviduct and uterine fluid and blood. *Reproduction, Fertility and Development* 22: 684-694.
- Hunter M G, Robinson R S, Mann G E, Webb R. 2004. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Animal Reproduction Science* 82-83: 461-477.
- Hunter R. 1991. Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Molecular Reproduction and Development* 29: 385-391.
- Hunter R H. 2005. The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? *Reproduction Nutrition and Development* 45: 281-290.
- Hunter R H. 2012a. Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc* 87: 244-255.
- Hunter R H. 2012b. Temperature gradients in female reproductive tissues. *Reprod Biomed Online* 24: 377-380.
- Hunter R H F. 2003. Formation and structure of ovaries: elaboration of follicular compartments. *Physiology of the Graafian Follicle and Ovulation*. In: Hunter R H F (Ed.). Cambridge University Press. Cambridge. pp. 24-52.
- Hussein T S, Thompson J G, Gilchrist R B. 2006. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev Biol* 296: 514-521.

- Hutt K J, Albertini D F. 2007. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reprod Biomed Online* 14: 758-764.
- Hyttel P. 1987. Bovine cumulus-oocyte disconnection in vitro. *Anat Embryol (Berl)* 176: 41-44.
- Hyttel P. 2011. Electron microscopy of mammalian oocyte development, maturation and fertilization. Oocyte Maturation and Fertilization: A long history for a short event. In: Tosti E, Boni R (Eds.). Bentham Science Publishers. Sharjah, UAE. pp. 1-37.
- Hyttel P, Callesen H, Greve T. 1986a. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 76: 645-656.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47: 23-32.
- Hyttel P, Greve T, Callesen H. 1989. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 38: 35-47.
- Hyttel P, Xu K, Smith S, Callesen H, Greve T. 1987. Ultrastructure of the final nuclear maturation of bovine oocytes in vitro. *Anat Embryol (Berl)* 176: 35-40.
- Hyttel P, Xu K P, Smith S, Greve T. 1986b. Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 78: 615-625.
- Ikeda S, Saeki K, Imai H, Yamada M. 2006. Abilities of cumulus and granulosa cells to enhance the developmental competence of bovine oocytes during in vitro maturation period are promoted by midkine; a possible implication of its apoptosis suppressing effects. *Reproduction* 132: 549-557.
- Imai K, Matoba S, Dochi O, Shimohira I. 2002. Different factors affect developmental competence and cryotolerance in in vitro produced bovine embryo. *Journal of Veterinary Medical Science* 64: 887-891.
- Inaba Y, Abe R, Geshi M, Matoba S, Nagai T, Somfai T. 2016. Sex-sorting of spermatozoa affects developmental competence of in vitro fertilized oocytes in a bull-dependent manner. *Journal of Reproduction and Development* 62: 451-456.
- Ireland J J, Roche J F. 1982. Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. *Endocrinology* 111: 2077-2086.
- Iritani A, Niwa K. 1977. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. *Journal of Reproduction and Fertility* 50: 119-121.
- Irvine D S. 1996. Glutathione as a treatment for male infertility. *Rev Reprod* 1: 6-12.
- Izadyar F, Colenbrander B, Bevers M. 1996. In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Molecular Reproduction and Development* 45: 372-377.
- Izadyar F, Hage W, Colenbrander B, Bevers M. 1998a. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. *Molecular Reproduction and Development* 49: 444-453.
- Izadyar F, Zeinstra E, Bevers M M. 1998b. Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 51: 339-345.
- Jančar N, Kopitar A N, Ihan A, Klun I V, Bokal E V. 2007. Effect of apoptosis and reactive oxygen species production in human granulosa cells on oocyte fertilization and blastocyst development. *J Assist Reprod Genet* 24: 91-97.
- Januskauskas A, Gil J, Soderquist L, Haard M G, Haard M C, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. 1999. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology* 52: 641-658.
- Javed M, Wright R. 1991. Determination of pentose phosphate and Embden-Meyerhof pathway activities in bovine embryos. *Theriogenology* 35: 1029-1037.
- Jeppesen J V, Kristensen S G, Nielsen M E, Humaidan P, Dal Canto M, Fadini R, Schmidt K T, Ernst E, Yding Andersen C. 2012. LH-receptor gene expression in human granulosa and

cumulus cells from antral and preovulatory follicles. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97: E1524-E1531.

Johnson L A. 1986. Flow cytometry: analysis and sorting of X and Y chromosome-bearing spermatozoa. *Biotechnology for Solving Agricultural Problems*. In: Augustine P C, Danforth H D, Bakst M R (Eds.). Springer Netherlands. Dordrecht. pp. 121-134.

Johnson L A. 1995. Sex preselection by flow cytometric separation of X and Y chromosome-bearing sperm based on DNA difference: a review. *Reproduction, Fertility and Development* 7: 893-903.

Johnson L A. 2000. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Animal Reproduction Science* 60-61: 93-107.

Johnson L A, Clarke R N. 1988. Flow sorting of X and Y chromosome-bearing mammalian sperm: Activation and pronuclear development of sorted bull, boar, and ram sperm microinjected into hamster oocytes. *Gamete Res* 21: 335-343.

Johnson L A, Flook J P, Look M V. 1987a. Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. *Gamete Res* 17: 203-212.

Johnson L A, Flook J P, Look M V, Pinkel D. 1987b. Flow sorting of X and Y chromosome-bearing spermatozoa into two populations. *Gamete Res* 16: 1-9.

Johnson L A, Pinkel D. 1986. Modification of a laser-based flow cytometer for high-resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa. *Cytometry* 7: 268-273.

Johnson L A, Welch G R. 1999. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* 52: 1323-1341.

Johnson L A, Welch G R, Rens W. 1999. The Beltsville sperm sexing technology: high-speed sperm sorting gives improved sperm output for in vitro fertilization and AI. *Journal of Animal Science* 77: 213-220.

Johnson M H, Nasr-Esfahani M H. 1994. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? *Bioessays* 16: 31-38.

Jones G M, Trounson A O, Gardner D K, Kausche A, Lolatgis N, Wood C. 1998. Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Human Reproduction* 13: 169-177.

Kaimio I, Mikkola M, Lindeberg H, Heikkinen J, Hasler J F, Taponen J. 2013. Embryo production with sex-sorted semen in superovulated dairy heifers and cows. *Theriogenology* 80: 950-954.

Kaji K, Kudo A. 2004. The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. *Reproduction* 127: 423-429.

Kanagawa H. 1979. Some aspects of bovine ova culture in vitro. *Japanese Journal of Veterinary Research* 27: 49-54.

Kane M T. 1987. Minimal nutrient requirements for culture of one-cell rabbit embryos. *Biol Reprod* 37: 775-778.

Kang S S, Koyama K, Huang W, Yanagawa Y, Takahashi Y, Nagano M. 2014. Addition of D-penicillamine, hypotaurine, and epinephrine (PHE) mixture to IVF medium maintains motility and longevity of bovine sperm and enhances stable production of blastocysts in vitro. *J Reprod Dev*.

Kashir J, Nomikos M, Lai F A, Swann K. 2014. Sperm-induced Ca²⁺ release during egg activation in mammals. *Biochem Biophys Res Commun* 450: 1204-1211.

Kasinathan P, Wei H, Xiang T, Molina J A, Metzger J, Broek D, Kasinathan S, Faber D C, Allan M F. 2015. Acceleration of genetic gain in cattle by reduction of generation interval. *Sci Rep* 5: 1-4.

Kastrop P, Bevers M, Destree O, Kruip T A. 1990. Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 90: 305-310.

- Kastrop P, Bevers M, Destree O, Kruijff T H. 1991. Protein synthesis and phosphorylation patterns of bovine oocytes maturing in vivo. *Molecular Reproduction and Development* 29: 271-275.
- Kato H, Iritani A. 1993. In vitro fertilization in cattle. *Molecular Reproduction and Development* 36: 229-231.
- Katska L, Kania G, Smorag Z, Wayda E, Plucienniczak G. 1999. Developmental capacity of bovine IVM/IVF oocytes with experimentally induced hardening of the zona pellucida. *Reproduction in Domestic Animals* 34: 255-259.
- Katska L, Kauffold P, Smorag Z, Duschinski U, Torner H, Kanitz W. 1989. Influence of hardening of the zona pellucida on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 32: 767-777.
- Katska L, Rynska B, Smorag Z. 1998. Developmental competence of bovine IVM/IVF oocytes under different co-culture conditions. *Journal of Animal and Feed Sciences* 7: 353-362.
- Kattal N, Cohen J, Barmat L I. 2008. Role of coculture in human in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fertil Steril* 90: 1069-1076.
- Kattera S, Chen C. 2003. Short coincubation of gametes in in vitro fertilization improves implantation and pregnancy rates: a prospective, randomized, controlled study. *Fertil Steril* 80: 1017-1021.
- Katz-Jaffe M G, Linck D W, Schoolcraft W B, Gardner D K. 2005. A proteomic analysis of mammalian preimplantation embryonic development. *Reproduction* 130: 899-905.
- Kaup U B, Kashikar N D, Weyand I. 2008. Mechanisms of sperm chemotaxis. *Annual Review of Physiology* 70: 93-117.
- Kawashima I, Okazaki T, Noma N, Nishibori M, Yamashita Y, Shimada M. 2008. Sequential exposure of porcine cumulus cells to FSH and/or LH is critical for appropriate expression of steroidogenic and ovulation-related genes that impact oocyte maturation in vivo and in vitro. *Reproduction* 136: 9-21.
- Kay V J, Robertson L. 1998. Hyperactivated motility of human spermatozoa: a review of physiological function and application in assisted reproduction. *Human Reproduction Update* 4: 776-786.
- Keefer C L, Stice S L, Paprocki A M, Golueke P. 1994. In vitro culture of bovine IVM-IVF embryos: Cooperative interaction among embryos and the role of growth factors. *Theriogenology* 41: 1323-1331.
- Keskintepe L, Brackett B G. 1996. In vitro developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol Reprod* 55: 333-339.
- Keskintepe L, Burnley C A, Brackett B G. 1995. Production of viable bovine blastocysts in defined in vitro conditions. *Biol Reprod* 52: 1410-1417.
- Khatir H, Lonergan P, Carolan C, Mermillod P. 1996. Prepubertal bovine oocyte: a negative model for studying oocyte developmental competence. *Molecular Reproduction and Development* 45: 231-239.
- Khatir H, Lonergan P, Mermillod P. 1998a. Kinetics of nuclear maturation and protein profiles of oocytes from prepubertal and adult cattle during in vitro maturation. *Theriogenology* 50: 917-929.
- Khatir H, Lonergan P, Touze J L, Mermillod P. 1998b. The characterization of bovine embryos obtained from prepubertal calf oocytes and their viability after non surgical embryo transfer. *Theriogenology* 50: 1201-1210.
- Khosla S, Dean W, Reik W, Feil R. 2001. Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype. *Human Reproduction Update* 7: 419-427.
- Khurana N K, Niemann H. 2000a. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology* 54: 741-756.
- Khurana N K, Niemann H. 2000b. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biol Reprod* 62: 847-856.

- Killian G. 2011. Physiology and endocrinology symposium: evidence that oviduct secretions influence sperm function: a retrospective view for livestock. *Journal of Animal Science* 89: 1315-1322.
- Killian G J. 2004. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Animal Reproduction Science* 82-83: 141-153.
- Kim E Y, Noh E H, Noh E J, Park M J, Park H Y, Lee D S, Riu K Z, Park S P. 2013. Effect of Glycosaminoglycans on In vitro Fertilizing Ability and In vitro Developmental Potential of Bovine Embryos. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 26: 178-188.
- Kim I H, Van Langendonck A, Van Soom A, Vanroose G, Casi A L, Hendriksen P J, Bevers M M. 1999. Effect of exogenous glutathione on the in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 52: 537-547.
- Kim J G, Parthasarathy S. 1998. Oxidation and the spermatozoa. *Semin Reprod Endocrinol* 16: 235-239.
- Kim J H, Funahashi H, Niwa K, Okuda K. 1993a. Glucose requirement at different developmental stages of in vitro fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. *Theriogenology* 39: 875-886.
- Kim J H, Niwa K, Lim J M, Okuda K. 1993b. Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of in vitro-matured, in vitro-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol Reprod* 48: 1320-1325.
- Kim K S, Minami N, Yamada M, Utsumi K. 1997. Follicular cells affect the fertilizability and developmental competency of bovine oocytes in vitro. *Reproduction, Fertility and Development* 9: 763-766.
- Kim N-H, Funahashi H, Abeydeera L R, Moon S J, Prather R S, Day B N. 1996. Effects of oviductal fluid on sperm penetration and cortical granule exocytosis during fertilization of pig oocytes in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 107: 79-86.
- Kim N H, Cho S K, Choi S H, Kim E Y, Park S P, Lim J H. 2000. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during in vitro maturation. *Zygote* 8: 25-32.
- Kirkegaard K, Agerholm I E, Ingerslev H J. 2012. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Human Reproduction* 27: 1277-1285.
- Kirkegaard K, Ahlstrom A, Ingerslev H J, Hardarson T. 2015. Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology. *Fertil Steril* 103: 323-332.
- Kishimoto T. 2003. Cell-cycle control during meiotic maturation. *Curr Opin Cell Biol* 15: 654-663.
- Kline J T, Kline D. 1994. Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: evidence for inositol trisphosphate-induced calcium release, but not calcium-induced calcium release. *Biol Reprod* 50: 193-203.
- Kobayashi J, Oguro H, Uchida H, Kohsaka T, Sasada H, Sato E. 2004. Assessment of bovine X- and Y-bearing spermatozoa in fractions by discontinuous percoll gradients with rapid fluorescence in situ hybridization. *Journal of Reproduction and Development* 50: 463-469.
- Kochhar H S, Kochhar K P, Basrur P K, King W A. 2003. Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of in vitro produced bovine embryos. *Animal Reproduction Science* 77: 33-49.
- Kolbe T, Holtz W. 2005. Differences in proteinase digestibility of the zona pellucida of in vivo and in vitro derived porcine oocytes and embryos. *Theriogenology* 63: 1695-1705.
- Konishi M, Aoyagi Y, Takedomi T, Itakura H, Itoh T, Yazawa S. 1996. Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved in vitro development of IVM-IVF bovine oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration. *Theriogenology* 45: 573-581.
- Kopf G S, Endo Y, Kurasawa S, Schultz R M. 1990. Molecular Mechanisms of Mammalian Sperm-Zona Pellucida Interaction: Crosstalk Between Sperm and Egg. *Advances in Assisted Reproductive Technologies*. In: Mashiach S, Ben-Rafael Z, Laufer N, Schenker J G (Eds.). Springer US. Boston, MA. pp. 415-436.

- Kovačič B. 2012. Culture Systems: Low-Oxygen Culture. Embryo Culture: Methods and Protocols. In: Smith D G, Swain E J, Pool B T (Eds.). Humana Press. Totowa, NJ. pp. 249-272.
- Koyama K, Kang S S, Huang W, Yanagawa Y, Takahashi Y, Nagano M. 2014a. Aging-related Changes in In Vitro-matured Bovine Oocytes: Oxidative Stress, Mitochondrial Activity and ATP Content After Nuclear Maturation. *Journal of Reproduction and Development* 60: 136-142.
- Koyama K, Kang S S, Huang W, Yanagawa Y, Takahashi Y, Nagano M. 2014b. Estimation of the optimal timing of fertilization for embryo development of in vitro-matured bovine oocytes based on the times of nuclear maturation and sperm penetration. *Journal of Veterinary Medical Science* 76: 653-659.
- Krisher R, Bavister B. 1998a. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology* 49: 103-114.
- Krisher R L. 2004. The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science* 82: E14-E23.
- Krisher R L. 2013. In vivo and in vitro environmental effects on mammalian oocyte quality. *Annual Review of Animal Biosciences* 1: 393-417.
- Krisher R L, Bavister B D. 1998b. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology* 49: 103-114.
- Krisher R L, Heuberger A L, Paczkowski M, Stevens J, Pospisil C, Prather R S, Sturmey R G, Herrick J R, Schoolcraft W B. 2015. Applying metabolomic analyses to the practice of embryology: physiology, development and assisted reproductive technology. *Reproduction, Fertility and Development* 27: 602-620.
- Krisher R L, Lane M, Bavister B D. 1999. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biol Reprod* 60: 1345-1352.
- Kruip T A, Bevers M M, Kemp B. 2000. Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. *Theriogenology* 53: 611-618.
- Kruip T A, Boni R, Wurth Y A, Roelofsen M W, Pieterse M C. 1994. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 42: 675-684.
- Kruip T A, Cran D, Van Beneden T H, Dieleman S. 1983. Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. *Gamete Res* 8: 29-47.
- Kruip T A, Pieterse M C, van Beneden T H, Vos P L, Wurth Y A, Taverne M A. 1991. A new method for bovine embryo production: a potential alternative to superovulation. *Veterinary Record* 128: 208-210.
- Kubota C, Yang X. 1998. Cytoplasmic incompetence results in poor development of bovine oocytes derived from small follicles. *Theriogenology* 49: 183.
- Kumar T R, Wang Y, Lu N, Matzuk M M. 1997. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet* 15: 201-204.
- Landim-Alvarenga F, Graham J, Alvarenga M, Squires E. 2004. Calcium influx into equine and bovine spermatozoa during in vitro capacitation. *Animal Reproduction* 1: 96-105.
- Landim-Alvarenga F C, Maziero R R D. 2014. Control of oocyte maturation. *Animal Reproduction* 11: 150-158.
- Lane M. 2001. Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress in vitro. *Theriogenology* 55: 225-236.
- Lane M, Gardner D. 1997a. Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes in vitro. *J Assist Reprod Genet* 14: 398-403.
- Lane M, Gardner D K. 1992. Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos in vitro. *Human Reproduction* 7: 558-562.
- Lane M, Gardner D K. 1996. Selection of viable mouse blastocysts prior to transfer using a metabolic criterion. *Human Reproduction* 11: 1975-1978.
- Lane M, Gardner D K. 1997b. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *Journal of Reproduction and Fertility* 109: 153-164.

- Lane M, Gardner D K. 2000. Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 62: 16-22.
- Lane M, Gardner D K. 2007. Embryo culture medium: which is the best? *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 21: 83-100.
- Lane M, Gardner D K, Hasler M J, Hasler J F. 2003a. 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.
- Lane M, Maybach J M, Hooper K, Hasler J F, Gardner D K. 2003b. Cryo-survival and development of bovine blastocysts are enhanced by culture with recombinant albumin and hyaluronan. *Molecular Reproduction and Development* 64: 70-78.
- Lane M, Mitchell M, Cashman K S, Feil D, Wakefield S, Zander-Fox D L. 2008. To QC or not to QC: the key to a consistent laboratory? *Reproduction, Fertility and Development* 20: 23-32.
- Lanzafame F, Chapman M G, Guglielmino A, Gearon C M, Forman R G. 1994. Pharmacological stimulation of sperm motility. *Human Reproduction* 9: 192-199.
- Lapointe J, Bilodeau J F. 2003. Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. *Biol Reprod* 68: 1157-1164.
- Larson J E, Lamb G C, Funnell B J, Bird S, Martins A, Rodgers J C. 2010. Embryo production in superovulated Angus cows inseminated four times with sexed-sorted or conventional, frozen-thawed semen. *Theriogenology* 73: 698-703.
- Larson M A, Kubisch H M. 1999. The effects of group size on development and interferon- γ secretion by in-vitro fertilized and cultured bovine blastocysts. *Human Reproduction* 14: 2075-2079.
- Laurincik J, Schmoll F, Mahabir E, Schneider H, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Prella K, Hendrixen P J, Voss P L, Moeszlacher G G, Avery B, Dieleman S J, Besenfelder U, Muller M, Ochs R L, Wolf E, Schellander K, Maddox-Hyttel P. 2003. Nucleolar proteins and ultrastructure in bovine in vivo developed, in vitro produced, and parthenogenetic cleavage-stage embryos. *Molecular Reproduction and Development* 65: 73-85.
- Lawrence L T, Moley K H. 2008. Epigenetics and assisted reproductive technologies: human imprinting syndromes. *Semin Reprod Med* 26: 143-152.
- Lazzari G, Colleoni S, Lagutina I, Crotti G, Turini P, Tessaro I, Brunetti D, Duchi R, Galli C. 2010. Short-term and long-term effects of embryo culture in the surrogate sheep oviduct versus in vitro culture for different domestic species. *Theriogenology* 73: 748-757.
- Lazzari G, Crotti G, Turini P, Notari C, Galli C. Supplementation of essential and nonessential amino-acids during IVF improves the quality of bovine embryos fertilized in SOF medium. 15th Meeting European Embryo Transfer Association (AETE). Lyon, France 1999. p. 180.
- Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Duchi R, Kruip T, Niemann H, Galli C. 2002. Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol Reprod* 67: 767-775.
- Leahy T, Gadella B M. 2011. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction* 142: 759-778.
- Lechniak D, Pers-Kamczyc E, Pawlak P. 2008. Timing of the first zygotic cleavage as a marker of developmental potential of mammalian embryos. *Reprod Biol* 8: 23-42.
- Lee E S, Fukui Y. 1996. Synergistic effect of alanine and glycine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acid uptake by vitro-produced bovine morulae and blastocysts. *Biol Reprod* 55: 1383-1389.
- Lee E S, Fukui Y, Lee B C, Lim J M, Hwang W S. 2004. Promoting effect of amino acids added to a chemically defined medium on blastocyst formation and blastomere proliferation of bovine embryos cultured in vitro. *Animal Reproduction Science* 84: 257-267.
- Lee K F, Yeung W S. 2006. Gamete/embryo - oviduct interactions: implications on in vitro culture. *Hum Fertil (Camb)* 9: 137-143.
- Lee M A, Storey B T. 1986. Bicarbonate is essential for fertilization of mouse eggs: mouse sperm require it to undergo the acrosome reaction. *Biol Reprod* 34: 349-356.

Lee M T, Bonneau A R, Giraldez A J. 2014. Zygotic genome activation during the maternal-to-zygotic transition. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30: 581-613.

Lee Y S, Thouas G A, Gardner D K. 2015. Developmental kinetics of cleavage stage mouse embryos are related to their subsequent carbohydrate and amino acid utilization at the blastocyst stage. *Human Reproduction* 30: 543-552.

Leese H J. 1988. The formation and function of oviduct fluid. *Journal of Reproduction and Fertility* 82: 843-856.

Leese H J. 1993. Energy Metabolism in Preimplantation Development. Preimplantation Embryo Development. In: Bavister B D (Ed.). Springer New York. New York, NY. pp. 73-82.

Leese H J. 1995. Metabolic control during preimplantation mammalian development. *Human Reproduction Update* 1: 63-72.

Leese H J. 1998. Human embryo culture: back to nature. *J Assist Reprod Genet* 15: 466-468.

Leese H J. 2002. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. *Bioessays* 24: 845-849.

Leese H J. 2003. What does an embryo need? *Hum Fertil (Camb)* 6: 180-185.

Leese H J. 2012. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction* 143: 417-427.

Leese H J. 2015. History of oocyte and embryo metabolism. *Reproduction, Fertility and Development* 27: 567-571.

Leese H J, Baumann C G, Brison D R, McEvoy T G, Sturmey R G. 2008a. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Mol Hum Reprod* 14: 667-672.

Leese H J, Hugentobler S A, Gray S M, Morris D G, Sturmey R G, Whitear S L, Sreenan J M. 2008b. Female reproductive tract fluids: composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease. *Reproduction, Fertility and Development* 20: 1-8.

Leese H J, Sturmey R G, Baumann C G, McEvoy T G. 2007. Embryo viability and metabolism: obeying the quiet rules. *Human Reproduction* 22: 3047-3050.

Leese H J, Tay J I, Reischl J, Downing S J. 2001. Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction* 121: 339-346.

Lefebvre R, Lo M C, Suarez S S. 1997. Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition. *Biol Reprod* 56: 1198-1204.

Lefebvre R, Suarez S S. 1996. Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biol Reprod* 54: 575-582.

Leibfried-Rutledge M, Critser E, First N. 1986. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. *Biol Reprod* 35: 850-857.

Leibfried-Rutledge M L. 1999. Factors determining competence of in vitro produced cattle embryos. *Theriogenology* 51: 473-485.

Leibfried-Rutledge M L, Critser E S, Eyestone W H, Northey D L, First N L. 1987. Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. *Biol Reprod* 36: 376-383.

Leibfried-Rutledge M L, Critser E S, Parrish J J, First N L. 1989. In vitro Maturation and Fertilization of Bovine Oocytes. *Theriogenology* 31: 61-74.

Leibo S P. 1984. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 21: 767-790.

Leibo S P, Loskutoff N M. 1993. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 39: 81-94.

Leivas F G, Brum D S, Fialho S S, Saliba W P, Alvim M T, Bernardi M L, Rubin M I, Silva C A. 2011. Fetal calf serum enhances in vitro production of *Bos taurus indicus* embryos. *Theriogenology* 75: 429-433.

Leivas F G, Brum D S, Saliba W P, Alvim M T, Bernardi M L, Rubin M I, Silva C A. 2006. Oxygen tension in IVM and IVF of bovine oocytes: effect on embryonic development and pregnancy rate. *Animal Reproduction* 3: 439-445.

- Lenz R W, Kjelland M E, Vonderhaar K, Swannack T M, Moreno J F. 2011. A comparison of bovine seminal quality assessments using different viewing chambers with a computer-assisted semen analyzer. *Journal of Animal Science* 89: 383-388.
- Leonetti T, Causio F, Cagnazzo G. 1995. Techniques of sperm selection and in vitro fertilization results. *Acta Eur Fertil* 26: 31-34.
- Leroy J L, Opsomer G, Van Soom A, Goovaerts I G, Bols P E. 2008a. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 612-622.
- Leroy J L, Rizos D, Sturmey R, Bossaert P, Gutierrez-Adan A, Van Hoeck V, Valckx S, Bols P E. 2011. Intrafollicular conditions as a major link between maternal metabolism and oocyte quality: a focus on dairy cow fertility. *Reproduction, Fertility and Development* 24: 1-12.
- Leroy J L, Sturmey R G, Van Hoeck V, De Bie J, McKeegan P J, Bols P E. 2014. Dietary fat supplementation and the consequences for oocyte and embryo quality: hype or significant benefit for dairy cow reproduction? *Reproduction in Domestic Animals* 49: 353-361.
- Leroy J L, Van Soom A, Opsomer G, Goovaerts I G, Bols P E. 2008b. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part II. Mechanisms linking nutrition and reduced oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 623-632.
- Leroy J L, Vanholder T, Mateusen B, Christophe A, Opsomer G, de Kruif A, Genicot G, Van Soom A. 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.
- Lessley B A, Garner D L. 1983. Isolation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation in Percoll®. *Gamete Res* 7: 49-61.
- Levesque J T, Sirard M A. 1994. Proteins in oocytes from calves and adult cows before maturation: relationship with their development capacity. *Reproduction Nutrition and Development* 34: 133-139.
- Levesque J T, Sirard M A. 1995. Effects of different kinases and phosphatases on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 42: 114-121.
- Levesque J T, Sirard M A. 1996. Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in bovine oocytes. *Biol Reprod* 55: 1427-1436.
- Levy R. 2001. Genetic regulation of preimplantation embryo survival. *International review of cytology* 210: 1-22.
- Lewin B. 1990. Driving the cell cycle: M phase kinase, its partners, and substrates. *Cell* 61: 743-752.
- Li L, Lu X, Dean J. 2013. The maternal to zygotic transition in mammals. *Mol Aspects Med* 34: 919-938.
- Li L, Zheng P, Dean J. 2010. Maternal control of early mouse development. *Development* 137: 859-870.
- Li R, Albertini D F. 2013. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14: 141-152.
- Li Y, Kalo D, Zeron Y, Roth Z. 2016. Progressive motility - a potential predictive parameter for semen fertilization capacity in bovines. *Zygote* 24: 70-82.
- Liang C G, Su Y Q, Fan H Y, Schatten H, Sun Q Y. 2007. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol* 21: 2037-2055.
- Lim J M, Hansel W. 1998. Improved development of in vitro-derived bovine embryos by use of a nitric oxide scavenger in a cumulus-granulosa cell coculture system. *Molecular Reproduction and Development* 50: 45-53.
- Lim J M, Mei Y, Chen B, Godke R A, Hansel W. 1999. Development of bovine IVF oocytes cultured in medium supplemented with a nitric oxide scavenger or inhibitor in a co-culture system. *Theriogenology* 51: 941-949.

- Lim K T, Jang G, Ko K H, Lee W W, Park H J, Kim J J, Lee S H, Hwang W S, Lee B C, Kang S K. 2007. Improved in vitro bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. *Theriogenology* 67: 293-302.
- Lin S P, Lee R K, Su J T, Lin M H, Hwu Y M. 2000. The effects of brief gamete co-incubation in human in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 17: 344-348.
- Lindemann C B, Kanous K S. 1989. Regulation of mammalian sperm motility. *Arch Androl* 23: 1-22.
- Lishko P V, Kirichok Y, Ren D, Navarro B, Chung J J, Clapham D E. 2012. The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annual Review of Physiology* 74: 453-475.
- Liu L, Ju J C, Yang X. 1998. Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 59: 537-545.
- Liu L, Kong N, Xia G, Zhang M. 2013. Molecular control of oocyte meiotic arrest and resumption. *Reproduction, Fertility and Development* 25: 463-471.
- Liu L, Yang X. 1999. Interplay of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase inactivation during metaphase-to-interphase transition of activated bovine oocytes. *Biol Reprod* 61: 1-7.
- Liu M. 2011. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reproductive Biology and Endocrinology* 9: 1-17.
- Liu W, Yin J, Zhao G, Yun Y, Wu S, Jones K T, Lei A. 2012. Differential regulation of cyclin B1 degradation between the first and second meiotic divisions of bovine oocytes. *Theriogenology* 78: 1171-1181.
- Liu X, Hu T, Sun W, Hao H, Liu Y, Zhao X, Zhu H, Du W. 2015. Comparison of the developmental competence and quality of bovine embryos obtained by in vitro fertilization with sex-sorted and unsorted semen from seven bulls. *Livestock Science* 181: 263-270.
- Liu Y, Holyoak G R, Wang S, Bunch T D. 1995. The importance of cumulus cells on the in vitro production of bovine oocytes. *Theriogenology* 43: 267-267.
- Liu Y, Sui H S, Wang H L, Yuan J H, Luo M J, Xia P, Tan J H. 2006. Germinal vesicle chromatin configurations of bovine oocytes. *Microsc Res Tech* 69: 799-807.
- Liu Z, Foote R H. 1995. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biol Reprod* 53: 786-790.
- Lohka M J, Hayes M K, Maller J L. 1988. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85: 3009-3013.
- Loneragan P. 1994. Growth of preimplantation bovine embryos. *Acta Vet Scand* 35: 307-320.
- Loneragan P. 2011. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology* 76: 1594-1601.
- Loneragan P, Carolan C, Mermillod P. 1994a. Development of bovine embryos in vitro following oocyte maturation under defined conditions. *Reproduction Nutrition and Development* 34: 329-339.
- Loneragan P, Fair T. 2008. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology* 69: 17-22.
- Loneragan P, Fair T. 2014. The ART of studying early embryo development: progress and challenges in ruminant embryo culture. *Theriogenology* 81: 49-55.
- Loneragan P, Fair T. 2016. Maturation of Oocytes in Vitro. *Annual Review of Animal Biosciences* 4: 255-268.
- Loneragan P, Fair T, Corcoran D, Evans A C. 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 65: 137-152.
- Loneragan P, Khatir H, Piumi F, Rieger D, Humblot P, Boland M P. 1999a. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and

- pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 117: 159-167.
- Loneragan P, Monaghan P, Rizos D, Boland M P, Gordon I. 1994b. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 37: 48-53.
- Loneragan P, O'Kearney-Flynn M, Boland M P. 1999b. 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.
- Loneragan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland M P. 2003. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reproduction in Domestic Animals* 38: 259-267.
- Loneragan P, Rizos D, Ward F, Boland M P. 2001. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reproduction Nutrition Development* 41: 427-437.
- Long C R, Damiani P, Pinto-Correia C, MacLean R A, Duby R T, Robl J M. 1994. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured in vitro under various conditions of fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility* 102: 361-369.
- Lopera-Vasquez R, Hamdi M, Fernandez-Fuertes B, Maillo V, Beltran-Brena P, Calle A, Redruello A, Lopez-Martin S, Gutierrez-Adan A, Yanez-Mo M, Ramirez M A, Rizos D. 2016. Extracellular Vesicles from BOEC in In Vitro Embryo Development and Quality. *PLoS One* 11: 1-23.
- Lopes A, Lane M, Thompson J. 2010a. Oxygen consumption and ROS production are increased at the time of fertilization and cell cleavage in bovine zygotes. *Human Reproduction* 25: 2762-2773.
- Lopes A S. 2012. Oxygen Consumption as an Indicator of Oocyte and Embryo Viability. *Practical Manual of In Vitro Fertilization: Advanced Methods and Novel Devices*. In: Nagy P Z, Varghese C A, Agarwal A (Eds.). Springer New York. New York, NY. pp. 413-420.
- Lopes A S, Greve T, Callesen H. 2007. Quantification of embryo quality by respirometry. *Theriogenology* 67: 21-31.
- Lopes A S, Lane M, Thompson J G. 2010b. Oxygen consumption and ROS production are increased at the time of fertilization and cell cleavage in bovine zygotes. *Human Reproduction* 25: 2762-2773.
- Lopez H, Satter L D, Wiltbank M C. 2004. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science* 81: 209-223.
- Lopez W O C, Alvis-Miranda H R, Gamarra A F, Rendon B, Borda D A V, Albicker U, Fonoff E T, Martinez-Diaz M. 2015. Effects of sexed semen and interactive effects on commercial in vitro embryo production when oocytes are collected from cows of *Bos indicus*, and *Bos taurus* breeding and crossbred cows of these subspecies. *Animal Reproduction Science* 156: 58-63.
- Lord T, Aitken R J. 2013. Oxidative stress and ageing of the post-ovulatory oocyte. *Reproduction* 146: R217-R227.
- Loughlin K R, Agarwal A. 1992. Use of theophylline to enhance sperm function. *Arch Androl* 28: 99-103.
- Lu J C, Huang Y F, Lu N Q. 2014. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia* 46: 329-338.
- Lu K H, Cran D G, Seidel G E, Jr. 1999. In vitro fertilization with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. *Theriogenology* 52: 1393-1405.
- Lu K H, Gordon I, Gallagher M, McGovern H. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilisation of oocytes matured in vitro. *Veterinary Record* 121: 259-260.
- Lu K H, Seidel G E, Jr. 2004. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. *Theriogenology* 62: 819-830.
- Luberda Z. 2005. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod Biol* 5: 5-17.

- Luciano A M, Modina S, Vassena R, Milanese 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.
- Lucy M C. 2001. Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will It End? *Journal of Dairy Science* 84: 1277-1293.
- Lucy M C. 2007a. The bovine dominant ovarian follicle. *Journal of Animal Science* 85: E89-E99.
- Lucy M C. 2007b. Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. *Reproduction and Fertility* 64: 237-254.
- Lucy M C, Savio J D, Badinga L, De La Sota R L, Thatcher W W. 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *Journal of Animal Science* 70: 3615-3626.
- Lui W Y, Mruk D, Lee W M, Cheng C Y. 2003. Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biol Reprod* 68: 1087-1097.
- Luo S-M, Schatten H, Sun Q-Y. 2013. Sperm Mitochondria in Reproduction: Good or Bad and Where Do They Go? *Journal of Genetics and Genomics* 40: 549-556.
- Lyng R, Shur B D. 2006. Sperm-egg binding requires a multiplicity of receptor-ligand interactions: new insights into the nature of gamete receptors derived from reproductive tract secretions. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65: 335-351.
- Lloyd R E, Romar R, Matas C, Gutierrez-Adan A, Holt W V, Coy P. 2009. Effects of oviductal fluid on the development, quality, and gene expression of porcine blastocysts produced in vitro. *Reproduction* 137: 679-687.
- MacDonald W A, Mann M R. 2014. Epigenetic regulation of genomic imprinting from germ line to preimplantation. *Molecular Reproduction and Development* 81: 126-140.
- Macedo G G, de Sá Filho M F, Vasconcelos Sala R, Ferreira Mendanha M, de Campos Filho E P, Sampaio Baruselli P. 2013. The Use Of Sex-Sorted Sperm For Reproductive Programs In cattle. Success in Artificial Insemination - Quality of Semen and Diagnostics Employed. In: Lemma A (Ed.). InTech. pp. 39-61.
- Machado G M, Carvalho J O, Filho E S, Caixeta E S, Franco M M, Rumpf R, Dode M A. 2009. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 71: 1289-1297.
- Machado M F, Caixeta E S, Sudiman J, Gilchrist R B, Thompson J G, Lima P F, Price C A, Buratini J. 2015. Fibroblast growth factor 17 and bone morphogenetic protein 15 enhance cumulus expansion and improve quality of in vitro-produced embryos in cattle. *Theriogenology* 84: 390-398.
- Machatkova M, Jokesova E, Horky F, Krepelova A. 2000. Utilization of the growth phase of the first follicular wave for bovine oocyte collection improves blastocyst production. *Theriogenology* 54: 543-550.
- Machatkova M, Jokesova E, Petelikova J, Dvoracek V. 1996. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 45: 801-810.
- Machatkova M, Krausova K, Jokesova E, Tomanek M. 2004. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology* 61: 329-335.
- Machtinger R, Racowsky C. 2012. Culture Systems: Single Step. *Embryo Culture: Methods and Protocols*. In: Smith D G, Swain E J, Pool B T (Eds.). Humana Press. Totowa, NJ. pp. 199-209.
- Maddox-Hyttel P, Bjerregaard B, Laurincik J. 2005. Meiosis and embryo technology: renaissance of the nucleolus. *Reproduction, Fertility and Development* 17: 3-14.
- Maddox-Hyttel P, Svarcova O, Laurincik J. 2007. Ribosomal RNA and nucleolar proteins from the oocyte are to some degree used for embryonic nucleolar formation in cattle and pig. *Theriogenology* 68: S63-S70.

Madrid-Bury N, Fernandez R, Jimenez A, Perez-Garnelo S, Moreira P N, Pintado B, de la Fuente J, Gutierrez-Adan A. 2003. Effect of ejaculate, bull, and a double swim-up sperm processing method on sperm sex ratio. *Zygote* 11: 229-235.

Maedomari N, Kikuchi K, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Ohnuma K, Nakai M, Shino M, Nagai T, Kashiwazaki N. 2007. Cytoplasmic glutathione regulated by cumulus cells during porcine oocyte maturation affects fertilization and embryonic development in vitro. *Theriogenology* 67: 983-993.

Maillo V, Sanchez-Calabuig M J, Lopera-Vasquez R, Hamdi M, Gutierrez-Adan A, Lonergan P, Rizo D. 2016. Oviductal response to gametes and early embryos in mammals. *Reproduction* 152: R127-R141.

Majerus V, Le Gal F, De Roover R, Donnay I, Massip A, Dessy F. 1999. Maturation competence is related to prepubertal calves oocyte diameter. *Theriogenology* 51: 385.

Majerus V, Lequarre A S, Ferguson E M, Kaidi S, Massip A, Dessy F, Donnay I. 2000. Characterization of embryos derived from calf oocytes: kinetics of cleavage, cell allocation to inner cell mass, and trophoblast and lipid metabolism. *Molecular Reproduction and Development* 57: 346-352.

Malcuit C, Kurokawa M, Fissore R A. 2006. Calcium oscillations and mammalian egg activation. *J Cell Physiol* 206: 565-573.

Manjunath P, Therien I. 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 53: 109-119.

Mantovani R, Rota A, Penzo N, Bittante G. 1999. Comparison among oocytes recovery methods for bovine embryo production in vitro. Istituto di Urologia, IRCSS Ospedale Maggiore, Milano. *Proceedings ASPA 13th Congress*. pp. 235-237.

Mapletoft R J, Hasler J F. 2005. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Revue Scientifique et Technique* 24: 393-403.

Marquant-Le Guenne B, Gerard M, Solari A, Thibault C. 1989. In vitro culture of bovine egg fertilized either in vivo or in vitro. *Reproduction Nutrition Development* 29: 559-568.

Marquant-Leguienne B, Humblot P. 1998. Practical measures to improve in vitro blastocyst production in the bovine. *Theriogenology* 49: 3-11.

Marquez B, Suarez S S. 2004. Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biol Reprod* 70: 1626-1633.

Marquez B, Suarez S S. 2007. Bovine Sperm Hyperactivation Is Promoted by Alkaline-Stimulated Ca²⁺ Influx. *Biol Reprod* 76: 660-665.

Marteil G, Richard-Parpaillon L, Kubiak J Z. 2009. Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. *Reprod Biol* 9: 203-224.

Martin P M, Sutherland A E, Van Winkle L J. 2003. Amino acid transport regulates blastocyst implantation. *Biol Reprod* 69: 1101-1108.

Martinez Arias A, Nichols J, Schroter C. 2013. A molecular basis for developmental plasticity in early mammalian embryos. *Development* 140: 3499-3510.

Massicotte L, Hyttel P, Sirard M A. 1999. Ultrastructure of oocytes from three month old calves treated with gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and follicle-stimulating hormone (FSH). *Theriogenology* 51: 305.

Massip A. 2001. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reproduction in Domestic Animals* 36: 49-55.

Massip A, Leibo S P. 2002. Factors Influencing Cryopreservation of Domestic Animal Embryos. Assessment of Mammalian Embryo Quality. In: Van Soom A, Boerjan M (Eds.). Springer Netherlands. pp. 121-138.

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.

Masui Y. 2001. From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). *Differentiation* 69: 1-17.

- Matsushita S, Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. 2004. Effect of low-temperature bovine ovary storage on the maturation rate and developmental potential of follicular oocytes after in vitro fertilization, parthenogenetic activation, or somatic cell nucleus transfer. *Animal Reproduction Science* 84: 293-301.
- Matsuyama K, Miyakoshi H, Fukui Y. 1993. Effect of glucose levels during the in vitro culture in synthetic oviduct fluid medium on in vitro development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* 40: 595-605.
- Mattioli M, Barboni B. 2000. Signal transduction mechanism for LH in the cumulus-oocyte complex. *Mol Cell Endocrinol* 161: 19-23.
- Matzuk M M, Burns K H, Viveiros M M, Eppig J J. 2002. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 296: 2178-2180.
- Maurer R R. 1978. Freezing mammalian embryos: a review of the techniques. *Theriogenology* 9: 45-68.
- Maxwell W M C, Evans G, Hollinshead F K, Bathgate R, de Graaf S P, Eriksson B M, Gillan L, Morton K M, O'Brien J K. 2004. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Animal Reproduction Science* 82-83: 79-95.
- Mayer J F, Jones E L, Dowling-Lacey D, Nehchiri F, Muasher S J, Gibbons W E, Oehninger S C. 2003. Total quality improvement in the IVF laboratory: choosing indicators of quality. *Reprod Biomed Online* 7: 695-699.
- Mayes M. 2002. The Meiotic Arrest of Bovine Oocytes. PhD Dissertation (Ph.D.), Laval University, Québec, Canada 171.
- Mayes M A, Sirard M A. 2001. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. *Theriogenology* 55: 911-922.
- Mayes M A, Sirard M A. 2002. Effect of type 3 and type 4 phosphodiesterase inhibitors on the maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest. *Biol Reprod* 66: 180-184.
- McEvoy T G, Robinson J J, Ashworth C J, Rooke J A, Sinclair K D. 2001. Feed and forage toxicants affecting embryo survival and fetal development. *Theriogenology* 55: 113-129.
- McKeegan P J, Sturmey R G. 2011. The role of fatty acids in oocyte and early embryo development. *Reproduction, Fertility and Development* 24: 59-67.
- McHughes C E, Springer G K, Spate L D, Li R, Woods R, Green M P, Korte S W, Murphy C N, Green J A, Prather R S. 2009. Identification and quantification of differentially represented transcripts in in vitro and in vivo derived preimplantation bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* 76: 48-60.
- Mehlmann L M. 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 130: 791-799.
- Meintjes M. 2012. Media Composition: Macromolecules and Embryo Growth. *Embryo Culture: Methods and Protocols*. In: Smith D G, Swain E J, Pool B T (Eds.). Humana Press. Totowa, NJ. pp. 107-127.
- Memili E, First N L. 2000. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote* 8: 87-96.
- Menck M C, Guyader-Joly C, Peynot N, Le Bourhis D, Lobo R B, Renard J P, Heyman Y. 1997. Beneficial effects of Vero cells for developing IVF bovine eggs in two different coculture systems. *Reproduction Nutrition and Development* 37: 141-150.
- Mendes J O, Jr., Burns P D, De La Torre-Sanchez J F, Seidel G E, Jr. 2003. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. *Theriogenology* 60: 331-340.
- Menezo Y, Veiga A, Benkhalifa M. 1998. Improved methods for blastocyst formation and culture. *Human Reproduction* 13: 256-265.
- Ménézo Y J R, Servy E, Veiga A, Hazout A, Elder K. 2012. Culture Systems: Embryo Co-Culture. *Embryo Culture: Methods and Protocols*. In: Smith G D, Swain J E, Pool T B (Eds.). Humana Press. Totowa, NJ, USA. pp. 231-247.

Mercader A, Valbuena D, Simon C. 2006. Human embryo culture. *Methods Enzymol* 420: 3-18.

Mermillod P, Dalbies-Tran R, Uzbekova S, Thelie A, Traverso J M, Perreau C, Papillier P, Monget P. 2008. Factors Affecting Oocyte Quality: Who is Driving the Follicle? *Reproduction in Domestic Animals* 43: 393-400.

Mermillod P, Oussaid B, Cognie Y. 1999. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 54: 449-460.

Merriman J A, Whittingham D G, Carroll J. 1998. The effect of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor on the developmental capacity of in-vitro matured mouse oocytes. *Human Reproduction* 13: 690-695.

Merton J S, Ask B, Onkundi D C, 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* 72: 885-893.

Merton J S, de Roos A P W, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos P L A M, Dieleman S J. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59: 651-674.

Merton J S, Haring R M, Stap J, Hoebe R A, Aten J A. 1997. Effect of flow cytometrically sorted frozen/thawed semen on success rate of in vitro bovine embryo production. *Theriogenology* 47: 295.

Miao Y L, Kikuchi K, Sun Q Y, Schatten H. 2009. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Human Reproduction Update* 15: 573-585.

Miller M R, Mansell S A, Meyers S A, Lishko P V. 2015. Flagellar ion channels of sperm: similarities and differences between species. *Cell Calcium* 58: 105-113.

Minami N, Suzuki T, Tsukamoto S. 2007. Zygotic gene activation and maternal factors in mammals. *Journal of Reproduction and Development* 53: 707-715.

Mitalipov S, Wolf D. 2009. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology* 114: 185-199.

Miyamura M, Yoshida M, Hamano S, Kuwayama M. 1995. Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. *Theriogenology* 43: 282-282.

Miyano T. 2003. Bringing up small oocytes to eggs in pigs and cows. *Theriogenology* 59: 61-72.

Miyano T, Manabe N. 2007. Oocyte growth and acquisition of meiotic competence. *Soc Reprod Fertil Suppl* 63: 531-538.

Miyazaki T, Arai S. 2007. Two distinct controls of mitotic cdk1/cyclin B1 activity requisite for cell growth prior to cell division. *Cell Cycle* 6: 1419-1425.

Mocé E, Graham J K. 2008. In vitro evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science* 105: 104-118.

Mocé E, Graham J K, Schenk J L. 2006. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. *Theriogenology* 66: 929-936.

Momozawa K, Fukuda Y. 2003. Caffeine in fertilization medium is not essential for bovine IVF by fully capacitated spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development* 49: 507-512.

Mondejar I, Martinez-Martinez I, Aviles M, Coy P. 2013. Identification of potential oviductal factors responsible for zona pellucida hardening and monospermy during fertilization in mammals. *Biol Reprod* 89: 1-8.

Montag M, Toth B, Strowitzki T. 2013. New approaches to embryo selection. *Reprod Biomed Online* 27: 539-546.

Moor R M, Dai Y, Lee C, Fulka J, Jr. 1998. Oocyte maturation and embryonic failure. *Human Reproduction Update* 4: 223-236.

Moore K, Rodriguez-Sallaberry C J, Kramer J M, Johnson S, Wroclawska E, Goicoa S, 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.

Morado S A, Cetica P D, Beconi M T, Dalvit G C. 2009. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction, Fertility and Development* 21: 608-614.

Moreno D, Neira A, Dubreil L, Liegeois L, Destrumelle S, Michaud S, Thorin C, Briand-Amirat L, Bencharif D, Tainturier D. 2015. In vitro bovine embryo production in a synthetic medium: embryo development, cryosurvival, and establishment of pregnancy. *Theriogenology* 84: 1053-1060.

Morgan H D, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. 2005. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 14: R47-R58.

Morotti F, Sanches B V, Pontes J H, Basso A C, Siqueira E R, Lisboa L A, Seneda M M. 2014. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. *Theriogenology* 81: 696-701.

Morrell J M. 2006. Update on semen technologies for animal breeding. *Reproduction in Domestic Animals* 41: 63-67.

Morrell J M, Garcia B M, Pena F J, Johannisson A. 2011a. Processing stored stallion semen doses by Single Layer Centrifugation. *Theriogenology* 76: 1424-1432.

Morrell J M, Rodriguez-Martinez H, Johannisson A. 2010. Single layer centrifugation of stallion spermatozoa improves sperm quality compared with sperm washing. *Reprod Biomed Online* 21: 429-436.

Morrell J M, van Wienen M, Wallgren M. 2011b. Single Layer Centrifugation Can Be Scaled-Up Further to Process up to 150 mL Semen. *International Scholarly Research Notices - Veterinary Science* 2011: 1-7.

Morrell J M, Wallgren M. 2011. Colloid centrifugation of boar semen. *Reproduction in Domestic Animals* 46: 18-22.

Mortimer D. 1994. Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity. *Reproduction, Fertility and Development* 6: 25-31.

Mortimer D. 2000a. Sperm Preparation Methods. *J Androl* 21: 357-366.

Mortimer D, Barratt C L R, Björndahl L, de Jager C, Jequier A M, Muller C H. 2013. What should it take to describe a substance or product as 'sperm-safe'. *Human Reproduction Update* 19: i1-i45.

Mortimer D, Mortimer S T. 1992. Methods of sperm preparation for assisted reproduction. *Annals Academy of Medicine Singapore* 21: 517-524.

Mortimer D, Mortimer S T. 2013. Density gradient separation of sperm for artificial insemination. *Spermatogenesis*. In: Carrell D T, Aston K I (Eds.). Humana Press. pp. 217-226.

Mortimer S T. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction Update* 3: 403-439.

Mortimer S T. 2000b. CASA--practical aspects. *J Androl* 21: 515-524.

Mortimer S T, Maxwell W M. 1999. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. *Reproduction, Fertility and Development* 11: 25-30.

Motlík J, Koefoed-Johnsen H H, Fulka J. 1978. Breakdown of the germinal vesicle in bovine oocytes cultivated in vitro. *Journal of Experimental Zoology* 205: 377-383.

Motlik J, Pavlok A, Kubelka M, Kalous J, Kalab P. 1998. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology* 49: 461-469.

Mucci N, Aller J, Kaiser G G, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio R H. 2006a. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 65: 1551-1562.

Mucci N, Aller J F, Kaiser G G, Hozbor F, Alberio R H. 2006b. In vitro production of bovine embryos: serum supplementation to the culture media. *Archivos de medicina veterinaria* 38: 97-104.

Mullaart E, Merton S M, de Ruigh L. 2002. Effect of FSH administration before OPU on oocyte, embryo and calf quality. In: AETE. (ed). Proceedings of 18th Meeting European Embryo Transfer Association. European Embryo Transfer Association. Rolduc, The Netherlands. p. 215.

Nagai T. 2001. The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology* 55: 1291-1301.

- Nagai T, Funahashi H, Yoshioka K, Kikuchi K. 2006. Up date of in vitro production of porcine embryos. *Frontiers in Bioscience* 11: 2565-2573.
- Nagao Y, Iijima R, Saeki K. 2008. Interaction between embryos and culture conditions during in vitro development of bovine early embryos. *Zygote* 16: 127-133.
- Nagao Y, Saeki K, Hoshi M, Kainuma H. 1994. Effects of oxygen concentration and oviductal epithelial tissue on the development of in vitro matured and fertilized bovine oocytes cultured in protein-free medium. *Theriogenology* 41: 681-687.
- Nagao Y, Saeki K, Nagai M. 1998. Effects of embryo density, oxygen concentration and medium composition on in vitro development of bovine early embryos. *Theriogenology* 49: 210.
- Nakao H, Nakatsuji N. 1990. Effects of co-culture, medium components and gas phase on in vitro culture of in vitro matured and in vitro fertilized bovine embryos. *Theriogenology* 33: 591-600.
- Nakao H, Nakatsuji N. 1992. Effects of Storage Conditions of Bovine Ovaries and Oocytes on the Success Rate of In Vitro Fertilization and Culture. *Journal of Reproduction and Development* 38: 11-13.
- Nasr-Esfahani M, Marziyeh T. 2015. Sperm Selection Based on Surface Electrical Charge. Non-Invasive Sperm Selection for In Vitro Fertilization. In: Agarwal A, Borges Jr E, Setti A S (Eds.). Springer New York. pp. 41-50.
- Nebreda A R, Ferby I. 2000. Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Curr Opin Cell Biol* 12: 666-675.
- Nedambale T L, Dinnyes A, Groen W, Dobrinsky J R, Tian X C, Yang X. 2004a. Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 62: 437-449.
- Nedambale T L, Dinnyes A, Yang X, Tian X C. 2004b. Bovine blastocyst development in vitro: timing, sex, and viability following vitrification. *Biol Reprod* 71: 1671-1676.
- Nedambale T L, Du F, Xu J, Chaubal S A, Dinnyes A, Groen W, Faber D, Dobrinsky J R, Yang X, Tian X C. 2006a. Prolonging bovine sperm-oocyte incubation in modified medium 199 improves embryo development rate and the viability of vitrified blastocysts. *Theriogenology* 66: 1951-1960.
- Nedambale T L, Du F, Yang X, Tian X C. 2006b. Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with beta-mercaptoethanol. *Animal Reproduction Science* 93: 61-75.
- Neira J A, Tainturier D, Peña M A, Martal J. 2010. Effect of the association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF- β 1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology* 73: 595-604.
- Newcomb R, Christie W B, Rowson L E. 1978. Birth of calves after in vivo fertilisation of oocytes removed from follicles and matured in vitro. *Veterinary Record* 102: 461-462.
- Niemann H, Wrenzycki C. 2000. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* 53: 21-34.
- Nishiyama T, Tachibana K, Kishimoto T. 2010. Cytostatic Arrest: Post-Ovulation Arrest until Fertilization in Metazoan Oocytes. *Oogenesis*. John Wiley & Sons, Ltd. pp. 357-384.
- Nivet A L, Bunel A, Labrecque R, Belanger J, Vigneault C, Blondin P, Sirard M A. 2012. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. *Reproduction* 143: 165-171.
- Niwa K, Ohgoda O. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on in-vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology* 30: 733-741.
- Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, Melchiorri L, Criscuoli L, Dabizzi S, Biagiotti R, Pellegrini S, Menicucci A, Baricordi O. 2005. Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Human Reproduction* 20: 138-146.

- Norman H D, Hutchison J L, VanRaden P M. 2011. Evaluations for service-sire conception rate for heifer and cow inseminations with conventional and sexed semen. *Journal of Dairy Science* 94: 6135-6142.
- Numabe T, Oikawa T, Kikuchi T, Horiuchi T. 2000. Birth weight and birth rate of heavy calves conceived by transfer of in vitro or in vivo produced bovine embryos. *Animal Reproduction Science* 64: 13-20.
- Numabe T, Oikawa T, Kikuchi T, Horiuchi T. 2001. Pentoxifylline improves in vitro fertilization and subsequent development of bovine oocytes. *Theriogenology* 56: 225-233.
- Nurse P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344: 503-508.
- Nuttinck F, Charpigny G, Mermillod P, Loosfelt H, Meduri G, Freret S, Grimard B, Heyman Y. 2004. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. *Domest Anim Endocrinol* 27: 179-195.
- O'Callaghan D, Lozanot J, Fahey J, Gath V, Snijders S, Boland M. 2000. Recent developments in the effect of nutrition on fertility in dairy cows. *Irish Veterinary Journal* 53: 417-425.
- O'Doherty E M, Wade M G, Hill J L, Boland M P. 1997. Effects of culturing bovine oocytes either singly or in groups on development to blastocysts. *Theriogenology* 48: 161-169.
- O'Herlihy C, Pepperell R J, Evans J H. 1980. The significance of FSH elevation in young women with disorders of ovulation. *Br Med J* 281: 1447-1450.
- O'Neill C. 2008. The potential roles for embryotrophic ligands in preimplantation embryo development. *Human Reproduction Update* 14: 275-288.
- O'Shaughnessy P. 2015. Testicular Development. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. In: Zeleznik A J (Ed.). Academic Press. San Diego. pp. 567-594.
- Oliveira L Z, Arruda R P, Celeghini E C, de Andrade A F, Perini A P, Resende M V, Miguel M C, Lucio A C, Hossepian de Lima V F. 2012. Effects of discontinuous Percoll gradient centrifugation on the quality of bovine spermatozoa evaluated with computer-assisted semen analysis and fluorescent probes association. *Andrologia* 44: 9-15.
- Oliveira P F, Alves M G. 2015a. Sertoli Cell and Germ Cell Differentiation. *Sertoli Cell Metabolism and Spermatogenesis*. Springer International Publishing. Cham. pp. 25-39.
- Oliveira P F, Alves M G. 2015b. The Sertoli Cell at a Glance. *Sertoli Cell Metabolism and Spermatogenesis*. Springer International Publishing. Cham. pp. 3-13.
- Oliveira P F, Alves M G. 2015c. Spermatogenesis. *Sertoli Cell Metabolism and Spermatogenesis*. Springer International Publishing. Cham. pp. 15-24.
- Olson S E, Seidel G E, Jr. 2000. Reduced oxygen tension and EDTA improve bovine zygote development in a chemically defined medium. *Journal of Animal Science* 78: 152-157.
- Opuwari C S, Henkel R R. 2016. An Update on Oxidative Damage to Spermatozoa and Oocytes. *Biomed Res Int* 2016: 1-11.
- Orisaka M, Tajima K, Tsang B K, Kotsuji F. 2009. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *J Ovarian Res* 2: 1-7.
- Orsi N M, Leese H J. 2004. Amino acid metabolism of preimplantation bovine embryos cultured with bovine serum albumin or polyvinyl alcohol. *Theriogenology* 61: 561-572.
- Orsi N M, Reischl J B. 2007. Mammalian embryo co-culture: trials and tribulations of a misunderstood method. *Theriogenology* 67: 441-458.
- Ottolenghi C, Uda M, Hamatani T, Crisponi L, Garcia J-E, Ko M, Pilia G, Sforza C, Schlessinger D, Forabosco A. 2004. Aging of Oocyte, Ovary, and Human Reproduction. *Ann N Y Acad Sci* 1034: 117-131.
- Paasch U, Grunewald S, Glander H J. 2007. Sperm selection in assisted reproductive techniques. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65: 515-525.
- Palasz A T, Rodriguez-Martinez H, Beltran-Breña P, Perez-Garnelo S, Martinez M F, Gutierrez-Adan A, De la Fuente J. 2006. Effects of hyaluronan, BSA, and serum on bovine embryo in vitro

development, ultrastructure, and gene expression patterns. *Molecular Reproduction and Development* 73: 1503-1511.

Palma G A. 2008. Producción in vitro de embriones bovinos. *Biotecnología de la Reproducción*. In: Palma G A (Ed.). Reprobiotec. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. pp. 313-380.

Palma G A, Olivier N S, Neumuller C, Sinowatz F. 2008. Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of in vitro fertilization and ultrastructure of in vitro produced bovine blastocysts. *Anat Histol Embryol* 37: 67-73.

Pandey A N, Tripathi A, Premkumar K V, Shrivastav T G, Chaube S K. 2010. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. *J Cell Biochem* 111: 521-528.

Panigone S, Hsieh M, Fu M, Persani L, Conti M. 2008. Luteinizing hormone signaling in preovulatory follicles involves early activation of the epidermal growth factor receptor pathway. *Mol Endocrinol* 22: 924-936.

Papi M, Brunelli R, Familiari G, Frassanito M C, Lamberti L, Maulucci G, Monaci M, Pappalettere C, Parasassi T, Relucenti M, Sylla L, Ursini F, De Spirito M. 2012. Whole-depth change in bovine zona pellucida biomechanics after fertilization: how relevant in hindering polyspermy? *PLoS One* 7: 1-7.

Papi M, Brunelli R, Sylla L, Parasassi T, Monaci M, Maulucci G, Missori M, Arcovito G, Ursini F, De Spirito M. 2010. Mechanical properties of zona pellucida hardening. *European Biophysics Journal* 39: 987-992.

Paria B C, Dey S K. 1990a. Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87: 4756-4160.

Paria B C, Dey S K. 1990b. Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 4756-4760.

Parikh F R, Nadkarni S G, Naik N J, Naik D J, Uttamchandani S A. 2006. Cumulus coculture and cumulus-aided embryo transfer increases pregnancy rates in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 86: 839-847.

Parinaud J, Mieusset R, Vieitez G, Labal B, Richoille G. 1993. Influence of sperm parameters on embryo quality. *Fertil Steril* 60: 888-892.

Park C K, Ohgoda O, Niwa K. 1989a. Penetration of bovine follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. *J Reprod Fertil* 86: 577-582.

Park C K, Ohgoda O, Niwa K. 1989b. Penetration of bovine follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. *Journal of Reproduction and Fertility* 86: 577-582.

Park J Y, Su Y Q, Ariga M, Law E, Jin S L, Conti M. 2004. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 303: 682-684.

Parrish J J. 2014. Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology* 81: 67-73.

Parrish J J, First N L. 1991. Bovine in Vitro Fertilization. A Comparative Overview of Mammalian Fertilization. In: Dunbar B S, O'Rand M G (Eds.). Springer US. Boston, MA. pp. 351-361.

Parrish J J, Kim C I, Bae I H. 1992. Current concepts of cell-cycle regulation and its relationship to oocyte maturation, fertilization and embryo development. *Theriogenology* 38: 277-296.

Parrish J J, Krogenaes A, Susko-Parrish J L. 1995. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 44: 859-869.

Parrish J J, Susko-Parrish J, Winer M A, First N L. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 38: 1171-1180.

Parrish J J, Susko-Parrish J L, First N L. 1985. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. *Theriogenology* 24: 537-549.

Parrish J J, Susko-Parrish J L, First N L. 1989a. Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod* 41: 683-699.

Parrish J J, Susko-Parrish J L, First N L. 1989b. Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod* 41: 683-699.

Parrish J J, Susko-Parrish J L, Graham J K. 1999. In vitro capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. *Theriogenology* 51: 461-472.

Parrish J J, Susko-Parrish J L, Leibfried-Rutledge M L, Critser E S, Eyestone W H, First N L. 1986. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25: 591-600.

Parrish J J, Susko-Parrish J L, Uguz C, First N L. 1994. Differences in the role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. *Biol Reprod* 51: 1099-1108.

Partridge R J, Leese H J. 1996. Consumption of amino acids by bovine preimplantation embryos. *Reproduction, Fertility and Development* 8: 945-950.

Paternot G, Debrock S, D'Hooghe T M, Spiessens C. 2010. Early embryo development in a sequential versus single medium: a randomized study. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8: 1-7.

Paula-Lopes F F, de Moraes A A, Edwards J L, Justice J E, Hansen P J. 1998. Regulation of preimplantation development of bovine embryos by interleukin-1beta. *Biol Reprod* 59: 1406-1412.

Paulini F, Silva R C, Rolo J L, Lucci C M. 2014. Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. *J Ovarian Res* 7: 1-12.

Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H. 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Molecular Reproduction and Development* 31: 63-67.

Pegoraro L M, Thuard J M, Delalleau N, Guerin B, Deschamps J C, Marquant Le Guienne B, Humblot P. 1998. Comparison of sex ratio and cell number of IVM-IVF bovine blastocysts co-cultured with bovine oviduct epithelial cells or with Vero cells. *Theriogenology* 49: 1579-1590.

Peippo J, Rätty M, Korhonen K, Eronen M, Kananen K, Hurme T, Halmekytö M, Mäki-Tanila A. 2010. Impact of in vitro fertilization of bovine oocytes with sex-sorted frozen-thawed spermatozoa on developmental kinetics, quality and sex ratio of developing embryos. *Zygote* 18: 185-194.

Peippo J, Vartia K, Kananen-Anttila K, Rätty M, Korhonen K, Hurme T, Myllymaki H, Sairanen A, Mäki-Tanila A. 2009. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. *Animal Reproduction Science* 111: 80-92.

Pellegrino C A G, Morotti F, Untura R M, Pontes J H F, Pellegrino M F O, Campolina J P, Seneda M M, Barbosa F A, Henry M. 2016. Use of sexed sorted semen for fixed-time artificial insemination or fixed-time embryo transfer of in vitro-produced embryos in cattle. *Theriogenology* 86: 888-893.

Peng X R, Hsueh A J, LaPolta P S, Bjersing L, Ny T. 1991. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology* 129: 3200-3207.

Perkel K J, Tscherner A, Merrill C, Lamarre J, Madan P. 2015. The ART of selecting the best embryo: A review of early embryonic mortality and bovine embryo viability assessment methods. *Molecular Reproduction and Development* 82: 822-838.

Petrunkina A M, Waberski D, Gunzel-Apel A R, Topfer-Petersen E. 2007. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction* 134: 3-17.

Picton H M. 2001. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology* 55: 1193-1210.

Picton H M, Danfour M A, Harris S E, Chambers E L, Huntriss J. 2003. Growth and maturation of oocytes in vitro. *Reproduction* 61: 445-462.

- Pieterse M C, Kappen K A, Kruip T A M, Taverne M A M. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30: 751-762.
- Pieterse M C, Vos P L, Kruip T A, Wurth Y A, van Beneden T H, Willemsse A H, Taverne M A. 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology* 35: 857-862.
- Pike I L. 1981. Comparative studies of embryo metabolism in early pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility* 29: 203-213.
- Pinkel D, Garner D L, Gledhill B L, Lake S, Stephenson D, Johnson L A. 1985. Flow cytometric determination of the proportions of X- and Y-chromosome-bearing sperm in samples of purportedly separated bull sperm. *Journal of Animal Science* 60: 1303-1307.
- Pinyopummintr T, Bavister B D. 1991. In vitro-matured/in vitro-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biol Reprod* 45: 736-742.
- Pinyopummintr T, Bavister B D. 1994. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: Effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology* 41: 1241-1249.
- Pinyopummintr T, Bavister B D. 1995. Optimum gas atmosphere for in vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 44: 471-477.
- Pinyopummintr T, Bavister B D. 1996a. Effects of amino acids on development in vitro of cleavage-stage bovine embryos into blastocysts. *Reproduction, Fertility and Development* 8: 835-841.
- Pinyopummintr T, Bavister B D. 1996b. Energy substrate requirements for in vitro development of early cleavage-stage bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* 44: 193-199.
- Plachot M. 1996. Co-culture of embryos and feeder cells. *Human Reproduction* 11: 35-42.
- Polejaeva I A, Chen S-H, Vaught T D, Page R L, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares D L. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407: 86-90.
- Polge C, Willadsen S M. 1978. Freezing eggs and embryos of farm animals. *Cryobiology* 15: 370-373.
- Pollard J W, Leibo S P. 1993. Comparative cryobiology of in vitro and in vivo derived bovine embryos. *Theriogenology* 39: 287-287.
- Pollard J W, Leibo S P. 1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 41: 101-106.
- Pompella A, Bánhegyi G, Wellman-Rousseau M. 2003. Thiol Metabolism and Redox Regulation of Cellular Functions. Series I: Life and Behavioural Sciences. *Free Radic Res* 37: 469-470.
- Ponsart C, Le Bourhis D, Knijn H, Fritz S, Guyader-Joly C, Otter T, Lacaze S, Charreaux F, Schibler L, Dupassieux D, Mullaart E. 2013. Reproductive technologies and genomic selection in dairy cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 26: 12-21.
- Pontes J H, Silva K C, Basso A C, Rigo A G, Ferreira C R, Santos G M, Sanches B V, Porcionato J P, Vieira P H, Faifer F S, Sterza F A, Schenk J L, Seneda M M. 2010. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology* 74: 1349-1355.
- Porter L A, Donoghue D J. 2003. Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators. *Prog Cell Cycle Res* 5: 335-347.
- Pousette A, Akerlof E, Rosenborg L, Fredricsson B. 1986. Increase in progressive motility and improved morphology of human spermatozoa following their migration through Percoll gradients. *Int J Androl* 9: 1-13.
- 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 (strict criteria). *Fertil Steril* 69: 722-726.

- Presicce G A, Jiang S, Simkin M, Zhang L, Looney C R, Godke R A, Yang X. 1997. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biol Reprod* 56: 386-392.
- Presicce G A, Xu J, Gong G, Moreno J F, Chaubal S, Xue F, Bella A, Senatore E M, Yang X, Tian X C, Du F. 2011. Oocyte Source and Hormonal Stimulation for In Vitro Fertilization Using Sexed Spermatozoa in Cattle. *Vet Med Int* 2011: 1-9.
- Pribenszky C, Lin L, Du Y, Losonczi E, Dinnyes A, Vajta G. 2012. Controlled Stress Improves Oocyte Performance – Cell Preconditioning in Assisted Reproduction. *Reproduction in Domestic Animals* 47: 197-206.
- Pribenszky C, Losonczi E, Molnar M, Lang Z, Matyas S, Rajczy K, Molnar K, Kovacs P, Nagy P, Conceicao J, Vajta G. 2010. Prediction of in-vitro developmental competence of early cleavage-stage mouse embryos with compact time-lapse equipment. *Reprod Biomed Online* 20: 371-379.
- Primakoff P, Myles D G. 2002. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science* 296: 2183-2185.
- Pryce J E, Royal M D, Garnsworthy P C, Mao I L. 2004. Fertility in the high-producing dairy cow. *Livestock Production Science* 86: 125-135.
- Pugh A, Cox S, Peterson J, Ledgard A, Forsyth J, Cockrem K, Tervit R. 2001. Culture of bovine embryos in sheep oviducts improves frozen but not fresh embryo survival. *Theriogenology* 55: 314.
- Putney D J, Drost M, Thatcher W W. 1988. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between Days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology* 30: 195-209.
- Putney D J, Drost M, Thatcher W W. 1989. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. *Theriogenology* 31: 765-778.
- Quill T A, Ren D, Clapham D E, Garbers D L. 2001. A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 12527-12531.
- Quinn P. 2000. Review of media used in ART laboratories. *J Androl* 21: 610-615.
- Quinn P. 2012. Culture Systems: Sequential. *Embryo Culture: Methods and Protocols*. In: Smith D G, Swain E J, Pool B T (Eds.). Humana Press. Totowa, NJ. pp. 211-230.
- Quinn P, Kerin J F, Warnes G M. 1985. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 44: 493-498.
- Quinn P, Lydic M L, Ho M, Bastuba M, Hendee F, Brody S A. 1998. Confirmation of the beneficial effects of brief coincubation of gametes in human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 69: 399-402.
- Ramathal C, Reijo Pera R A, Chavez S L. 2015. Preimplantation Embryo Development and Primordial Germ Cell Lineage Specification. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. In: Plant T M, Zeleznik A J (Eds.). Academic Press. San Diego. pp. 233-265.
- Rath D, Johnson L A. 2008. Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted semen. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 338-346.
- Rath D, Moench-Tegeder G, Taylor U, Johnson L A. 2009. Improved quality of sex-sorted sperm: a prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology* 71: 22-29.
- Rath D, Schuberth H J, Coy P, Taylor U. 2008. Sperm interactions from insemination to fertilization. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 2-11.
- Raz T, Shalgi R. 1998. Early events in mammalian egg activation. *Human Reproduction* 13: 133-145.
- Redding G P, Bronlund J E, Hart A L. 2008. Theoretical investigation into the dissolved oxygen levels in follicular fluid of the developing human follicle using mathematical modelling. *Reproduction, Fertility and Development* 20: 408-417.

- Reed M L. 2012. Culture Systems: Embryo Density. *Embryo Culture: Methods and Protocols*. In: Smith D G, Swain E J, Pool B T (Eds.). Humana Press. Totowa, NJ. pp. 273-312.
- Reed M L, Woodward B J, Swain J E. 2011. Single or group culture of mammalian embryos: the verdict of the literature. *Journal of Reproductive Biotechnology and Fertility* 2: 77-87.
- Reed W A, Suh T K, Bunch T D, White K L. 1996. Culture of in vitro fertilized bovine embryos with bovine oviductal epithelial cells, Buffalo rat liver (BRL) cells, or BRL-cell-conditioned medium. *Theriogenology* 45: 439-449.
- Rehman N, Collins A R, Suh T K, Wright R W, Jr. 1994. Effect of sperm exposure time on in vitro fertilization and embryo development of bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 41: 1447-1452.
- Reis A, Rooke J A, McCallum G J, Staines M E, Ewen M, Lomax M A, McEvoy T G. 2003. Consequences of exposure to serum, with or without vitamin E supplementation, in terms of the fatty acid content and viability of bovine blastocysts produced in vitro. *Reproduction, Fertility and Development* 15: 275-284.
- Reizel Y, Elbaz J, Dekel N. 2010. Sustained activity of the EGF receptor is an absolute requisite for LH-induced oocyte maturation and cumulus expansion. *Mol Endocrinol* 24: 402-411.
- Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson A C, Hsu S, Shi Q, Tilly J L, Clapham D E. 2001. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 413: 603-609.
- Renard J-P, Philippon A, Menezes Y. 1980. In-vitro uptake of glucose by bovine blastocysts. *Journal of Reproduction and Fertility* 58: 161-164.
- Renaudeau D, Collin A, Yahav S, de Basilio V, Gourdiere J L, Collier R J. 2012. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Animal* 6: 707-728.
- Revel F, Mermillod P, Peynot N, Renard J, 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.
- Rexroad C E. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology* 31: 105-114.
- Rho G J, S B, Kim D S, Son W J, Cho S R, Kim J G, B M K, Choe S Y. 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.
- Richard F J. 2007. Regulation of meiotic maturation. *Journal of Animal Science* 85: E4-E6.
- Richard F J, Sirard M A. 1996. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. *Biol Reprod* 54: 22-28.
- Richards J S. 1994. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* 15: 725-751.
- Richards J S, Pangas S A. 2010. The ovary: basic biology and clinical implications. *Journal of Clinical Investigation* 120: 963-972.
- Richardson J, Irving L, Hyslop L A, Choudhary M, Murdoch A, Turnbull D M, Herbert M. 2015. Concise reviews: Assisted reproductive technologies to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Stem Cells* 33: 639-645.
- Richter K S. 2008. The importance of growth factors for preimplantation embryo development and in-vitro culture. *Curr Opin Obstet Gynecol* 20: 292-304.
- Rieger D. 1992. Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. *Theriogenology* 37: 75-93.
- Rieger D, Loskutoff N M. 1994. Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 100: 257-262.
- Rieger D, Loskutoff N M, Betteridge K J. 1992a. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 95: 585-595.
- Rieger D, Loskutoff N M, Betteridge K J. 1992b. Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced in vitro. *Reproduction, Fertility and Development* 4: 547-557.

Rizos D, Burke L, Duffy P, Wade M, Mee J F, O'Farrell K J, Macsiurtain M, Boland M P, Lonergan P. 2005. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production in vitro. *Theriogenology* 63: 939-949.

Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, De La Fuente J, Lonergan P, Gutiérrez-Adán A. 2008. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 44-50.

Rizos D, Fair T, Papadopoulos S, Boland M P, Lonergan P. 2002a. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 62: 320-327.

Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland M P, 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.

Rizos D, Lonergan P, Boland M P, Arroyo-Garcia R, Pintado B, de la Fuente J, Gutierrez-Adan A. 2002b. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol Reprod* 66: 589-595.

Rizos D, Ramirez M A, Pintado B, Lonergan P, Gutierrez-Adan A. 2010. Culture of bovine embryos in intermediate host oviducts with emphasis on the isolated mouse oviduct. *Theriogenology* 73: 777-785.

Rizos D, Ward F, Boland M P, Lonergan P. 2001. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology* 56: 1-16.

Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland M P, Lonergan P. 2002c. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development* 61: 234-248.

Robaire B, Hinton B T. 2015. The Epididymis. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. In: Plant T M, Zeleznik A J (Eds.). Academic Press. San Diego. pp. 691-771.

Robert C, Gagne D, Lussier J G, Bousquet D, Barnes F L, Sirard M A. 2003. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. *Reproduction* 125: 437-446.

Rocha A, Randel R D, Broussard J R, Lim J M, Blair R M, Roussel J D, Godke R A, Hansel W. 1998. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology* 49: 657-665.

Roche J, Mihn M, Diskin M, Ireland J. 1998. A review of regulation of follicle growth in cattle. *Journal of Animal Science* 76: 16-29.

Roche J F. 2006. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Animal Reproduction Science* 96: 282-296.

Roche J R, Friggens N C, Kay J K, Fisher M W, Stafford K J, Berry D P. 2009. Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *Journal of Dairy Science* 92: 5769-5801.

Rodeheffer C, Shur B D. 2004. Characterization of a novel ZP3-independent sperm-binding ligand that facilitates sperm adhesion to the egg coat. *Development* 131: 503-512.

Rødgaard T, Heegaard P M H, Callesen H. 2015. Non-invasive assessment of in-vitro embryo quality to improve transfer success. *Reprod Biomed Online* 31: 585-592.

Rodriguez-Martinez H. 2007a. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology* 68: S138-S146.

Rodriguez-Martinez H. 2007b. State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reproduction, Fertility and Development* 19: 91-101.

Rodriguez-Martinez H, Larsson B, Pertoft H. 1997. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reproduction, Fertility and Development* 9: 297-308.

Rodriguez Villamil P, Wei H, Moreira G, Caccia M, Fernandez Taranco M, Bo G A. 2012. Fertilization rates and in vitro embryo production using sexed or non-sexed semen selected with a silane-coated silica colloid or Percoll. *Theriogenology* 78: 165-171.

- Rooke J A, McEvoy T G, Ashworth C J, Robinson J J, Wilmut I, Young L E, Sinclair K D. 2007. Ovine fetal development is more sensitive to perturbation by the presence of serum in embryo culture before rather than after compaction. *Theriogenology* 67: 639-647.
- Rose B I. 2014. Approaches to oocyte retrieval for advanced reproductive technology cycles planning to utilize in vitro maturation: a review of the many choices to be made. *J Assist Reprod Genet* 31: 1409-1419.
- Rose T A, Bavister B D. 1992. Effect of oocyte maturation medium on in vitro development of in vitro fertilized bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* 31: 72-77.
- Rosenkrans C F, First N L. 1994. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. *Journal of Animal Science* 72: 434-437.
- Rosenkranz C, Holzmann A. 1997. The effect of sperm preparation on the timing of penetration in bovine in vitro fertilization. *Animal Reproduction Science* 46: 47-53.
- Rowe R, Del Campo M, Eilts C, French L, Winch R, Ginther O. 1976. A single cannula technique for nonsurgical collection of ova from cattle. *Theriogenology* 6: 471-483.
- Roy K S, Collier R. 2012. Regulation of acclimation to environmental stress. *Environmental Physiology of Livestock*: 49-63.
- Ruder E H, Hartman T J, Blumberg J, Goldman M B. 2008. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Human Reproduction Update* 14: 345-357.
- Rueda B R, Tilly K I, Hansen T R, Hoyer P B, Tilly J L. 1995. Expression of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the bovine corpus luteum: evidence supporting a role for oxidative stress in luteolysis. *Endocrine* 3: 227-232.
- Ruiz López L, Alvarez N V, Nuñez I, Montes I, Solano R, Fuentes D, Pedroso R, Palma G A, Brem G. 1996. Effect of body condition on the developmental competence of IVM/IVF bovine oocytes. *Theriogenology* 1: 292.
- Russell L D, Peterson R. 1985. Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. *International review of cytology* 94: 177-211.
- Rutledge J J, Monson R L, Northey D L, Leibfried-Rutledge M L. 1999. Seasonality of cattle embryo production in a temperate region. *Theriogenology* 51: 330.
- Ryter S W, Kim H P, Hoetzel A, Park J W, Nakahira K, Wang X, Choi A M. 2007. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 9: 49-89.
- Saacke R G, Almquist J O. 1964. Ultrastructure of bovine spermatozoa. I. The head of normal, ejaculated sperm. *American Journal of Anatomy* 115: 143-161.
- Saeki K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge M, First N. 1990. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured with commercially available follicle stimulating hormone. *Theriogenology* 34: 1035-1039.
- Saeki K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge M, First N. 1991. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol Reprod* 44: 256-260.
- Saeki K, Nagao Y, Hoshi M, Kainuma H. 1994. Effects of cumulus cells on sperm penetration of bovine oocytes in protein-free medium. *Theriogenology* 42: 1115-1123.
- Saeki K, Nagao Y, Hoshi M, Nagai M. 1995. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on in vitro fertilization of bovine oocytes in a protein-free medium. *Theriogenology* 43: 751-759.
- Sagata N. 1996. Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: its mechanisms and biological significance. *Trends Cell Biol* 6: 22-28.
- Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First N L, Parrish J J, Memili E. 2007. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Animal Reproduction Science* 101: 225-240.
- Sakkas D. 2014. Morphological and Metabolic Assessment of Oocytes and Embryos. *Gamete and Embryo Selection: Genomics, Metabolomics and Morphological Assessment*. Springer New York. New York, NY. pp. 1-13.
- Sakkas D, Gardner D K. 2005. Noninvasive methods to assess embryo quality. *Curr Opin Obstet Gynecol* 17: 283-288.

- Salahuddin S, Ookutsu S, Goto K, Nakanishi Y, Nagata Y. 1995. Effects of embryo density and co-culture of unfertilized oocytes on embryonic development of in-vitro fertilized mouse embryos. *Human Reproduction* 10: 2382-2385.
- Salamone D F, Damiani P, Fissore R A, Robl J M, Duby R T. 2001. Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. *Biol Reprod* 64: 1761-1768.
- Salehnia M, Zavareh S. 2013. The effects of progesterone on oocyte maturation and embryo development. *Int J Fertil Steril* 7: 74-81.
- Salustri A, Yanagishita M, Hascall V C. 1989. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. *Journal of Biological Chemistry* 264: 13840-13847.
- Samardžija M, Dobranić T, Karadjole M, Getz I, Vince S, Gračner D, Mačević N, Filaković I. 2006. The efficacy of gradient Percoll® on bull sperm separation for in vitro fertilization. *Veterinary Archives* 76: 37-44.
- Samardžija M, Karadjole M, Getz I, Makek Z, Cergolj M, Dobranic T. 2006a. Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4: 1-7.
- Samardžija M, Karadjole M, Matkovic M, Cergolj M, Getz I, Dobranic T, Tomaskovic A, Petric J, Surina J, Grizelj J, Karadjole T. 2006b. A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. *Animal Reproduction Science* 91: 237-247.
- Sang L, Yang W C, Han L, Liang A X, Hua G H, Xiong J J, Huo L J, Yang L G. 2011. An immunological method to screen sex-specific proteins of bovine sperm. *Journal of Dairy Science* 94: 2060-2070.
- Sanocka D, Kurpisz M. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2: 1-7.
- Santi C M, Orta G, Salkoff L, Visconti P E, Darszon A, Trevino C L. 2013. K⁺ and Cl⁻ channels and transporters in sperm function. *Curr Top Dev Biol* 102: 385-421.
- Santos J E, Cerri R L, Sartori R. 2008. Nutritional management of the donor cow. *Theriogenology* 69: 88-97.
- Saragusty J, Arav A. 2011. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction* 141: 1-19.
- Sartori R, Bastos M R, Wiltbank M C. 2009. Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 22: 151-158.
- Sartori R, Haughian J M, Shaver R D, Rosa G J, Wiltbank M C. 2004. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science* 87: 905-920.
- Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens S A, Guenther J N, Parrish J J, Wiltbank M C. 2002. Fertilization and Early Embryonic Development in Heifers and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter. *Journal of Dairy Science* 85: 2803-2812.
- Sasseville M, Gagnon M C, Guillemette C, Sullivan R, Gilchrist R B, Richard F J. 2009. Regulation of gap junctions in porcine cumulus-oocyte complexes: contributions of granulosa cell contact, gonadotropins, and lipid rafts. *Mol Endocrinol* 23: 700-710.
- Sato M, Sato K. 2013. Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta* 1833: 1979-1984.
- Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. 2000. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Human Reproduction* 15: 2394-2403.
- Schatten H. 2008. Overview of Fertilization. *Comparative Reproductive Biology*. In: Schatten H, Constantinescu G M (Eds.). Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK. pp. 111-115.

- Schenk J L, Cran D G, Everett R W, Seidel G E, Jr. 2009. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. *Theriogenology* 71: 717-728.
- Schenk J L, Seidel G E, Jr. 2007. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed spermatozoa: effects of laser intensity, staining conditions and catalase. *Soc Reprod Fertil Suppl* 64: 165-177.
- Schenk J L, Suh T K, Cran D G, Seidel G E, Jr. 1999. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology* 52: 1375-1391.
- Schenk J L, Suh T K, Seidel G E, Jr. 2006. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology* 65: 299-307.
- Schernthaner W, Schmoll F, Brem G, Schellander K. 1997. Storing bovine ovaries for 24 hours between 15 and 21 °C does not influence in vitro production of blastocysts. *Theriogenology* 47: 297.
- Schier A F. 2007. The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs. *Science* 316: 406-407.
- Schmaltz-Panneau B, Cordova A, Dhorne-Pollet S, Hennequet-Antier C, Uzbekova S, Martinot E, Doret S, Martin P, Mermillod P, Locatelli Y. 2014. Early bovine embryos regulate oviduct epithelial cell gene expression during in vitro co-culture. *Animal Reproduction Science* 149: 103-116.
- Schmaltz-Panneau B, Locatelli Y, Uzbekova S, Perreau C, Mermillod P. 2015. Bovine Oviduct Epithelial Cells Dedifferentiate Partly in Culture, While Maintaining their Ability to Improve Early Embryo Development Rate and Quality. *Reproduction in Domestic Animals* 50: 719-729.
- Schmidt M, Hyttel P, Greve T, Avery B. 1993. Ultrastructure of frozen/thawed bovine in vitro matured oocytes. *Theriogenology* 39: 304.
- Schmitt A, Nebreda A R. 2002. Signalling pathways in oocyte meiotic maturation. *J Cell Sci* 115: 2457-2459.
- Seidel G E, Jr. 1999. Sexing mammalian spermatozoa and embryos - state of the art. *Journal of Reproduction and Fertility*: 477-487.
- Seidel G E, Jr. 2003a. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. *Theriogenology* 59: 585-598.
- Seidel G E, Jr. 2003b. Sexing mammalian sperm--intertwining of commerce, technology, and biology. *Animal Reproduction Science* 79: 145-156.
- Seidel G E, Jr. 2006. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology* 65: 228-235.
- Seidel G E, Jr. 2007. Overview of sexing sperm. *Theriogenology* 68: 443-446.
- Seidel G E, Jr. 2012. Sexing mammalian sperm - Where do we go from here? *Journal of Reproduction and Development* 58: 505-509.
- Seidel G E, Jr., Garner D L. 2002. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction* 124: 733-743.
- Sellem E, Broekhuijse M L, Chevrier L, Camugli S, Schmitt E, Schibler L, Koenen E P. 2015. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology* 84: 1447-1454.
- Senatore E M, Xu J, Suárez Novoa M V, Gong G, Lin T, Bella A, Moreno J F, Mannino M E, Tian X, Presicce G A, Wu S C, Du F. 2010. Improved in vitro development of OPU-derived bovine (*Bos taurus*) embryos by group culture with agarose-embedded helper embryos. *Theriogenology* 74: 1643-1651.
- Senbon S, Hirao Y, Miyano T. 2003. Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from in vitro culture. *Journal of Reproduction and Development* 49: 259-269.
- Sendag S, Cetin Y, Alan M, Haderler K-G, Niemann H. 2008. Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. *Animal Reproduction Science* 106: 208-214.

Seong-Su K, Byung-Hyun C, Kyeong-Lim L, Jong-In J, Tae-Kwang S, Cheol-Ho S, Chan-Ho P, Seung-Oh S, Kwang-Jin H, Hyun-Tae L, Kyu-Woan C, Il-Keun K. 2015. Increase of Production Ratio of Pre-selected Superior Dairy Female Offspring by Combination of OPU derived Oocytes and X-bearing Semen. *Journal of Embryo Transfer* 30: 73-82.

Seshagiri P B, Sen Roy S, Sireesha G, Rao R P. 2009. Cellular and molecular regulation of mammalian blastocyst hatching. *J Reprod Immunol* 83: 79-84.

Sha W, Xu B Z, Li M, Liu D, Feng H L, Sun Q Y. 2010. Effect of gonadotropins on oocyte maturation in vitro: an animal model. *Fertil Steril* 93: 1650-1661.

Shamsuddin M, Larsson B, Rodriguez-Martinez H. 1993. Maturation-related changes in bovine oocytes under different culture conditions. *Animal Reproduction Science* 31: 49-60.

Shepard T H, Tanimura T, Robkin M A. 1970. Energy metabolism in early mammalian embryos. Changing syntheses in development: 42-58.

Shi L, Wu J. 2009. Epigenetic regulation in mammalian preimplantation embryo development. *Reproductive Biology and Endocrinology* 7: 1-11.

Shimada M, Nishibori M, Isobe N, Kawano N, Terada T. 2003. Luteinizing hormone receptor formation in cumulus cells surrounding porcine oocytes and its role during meiotic maturation of porcine oocytes. *Biol Reprod* 68: 1142-1149.

Shimada M, Terada T. 2002. FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells: a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes. *Mol Hum Reprod* 8: 612-618.

Shook G E. 2006. Major advances in determining appropriate selection goals. *Journal of Dairy Science* 89: 1349-1361.

Shulman A, Ben-Nun I, Ghetler Y, Kaneti H, Shilon M, Beyth Y. 1993. Relationship between embryo morphology and implantation rate after in vitro fertilization treatment in conception cycles. *Fertil Steril* 60: 123-126.

Silva-Santos K C, Marinho L S R, Santos G M G, Machado F Z, Gonzalez S M, Lisboa L A, Seneda M M. 2013. Ovarian follicle reserve: emerging concepts and applications. *Animal Reproduction* 10: 180-186.

Silva-Santos K C, Santos G M G, Siloto L S, Hertel M F, Andrade E R, Rubin M I B, Sturion L, Melo-Sterza F A, Seneda M M. 2011. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology* 76: 1051-1057.

Silvestre F, Fissore R A, Tosti E, Boni R. 2012. $[Ca^{2+}]_i$ rise at in vitro maturation in bovine cumulus-oocyte complexes. *Molecular Reproduction and Development* 79: 369-379.

Simon L, Ge S Q, Carrell D T. 2013. Sperm selection based on electrostatic charge. *Methods Mol Biol* 927: 269-278.

Sinclair K D. 2008. Assisted reproductive technologies and pregnancy outcomes: mechanistic insights from animal studies. *Semin Reprod Med* 26: 153-161.

Sinclair K D, Rooke J A, McEvoy T G. 2003. Regulation of nutrient uptake and metabolism in pre-elongation ruminant embryos. *Reproduction* 61: 371-385.

Siqueira Filho E, Caixeta E S, Pribenszky C, Molnar M, Horvath A, Harnos A, Franco M M, Rumpf R. 2011. Vitrification of bovine blastocysts pretreated with sublethal hydrostatic pressure stress: evaluation of post-thaw in vitro development and gene expression. *Reproduction, Fertility and Development* 23: 585-590.

Sirard M A. 2001. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 55: 1241-1254.

Sirard M A. 2011. Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. *J Assist Reprod Genet* 28: 483-488.

Sirard M A, Blondin P. 1996. Oocyte maturation and IVF in cattle. *Animal Reproduction Science* 42: 417-426.

Sirard M A, Blondin P. 1998. Oocyte quality and embryo production in cattle. *Canadian Journal of Animal Science* 78: 513-516.

- Sirard M A, Coenen K. 2006. In vitro maturation and embryo production in cattle. *Methods Mol Biol* 348: 35-42.
- Sirard M A, Desrosier S, Assidi M. 2007. In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. *Theriogenology* 68: S71-S76.
- Sirard M A, First N L. 1988. In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol Reprod* 39: 229-234.
- Sirard M A, Florman H M, Leibfried-Rutledge M L, Barnes F L, Sims M L, First N L. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 40: 1257-1263.
- Sirard M A, Parrish J J, Ware C B, Leibfried-Rutledge M L, First N L. 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol Reprod* 39: 546-552.
- Sirard M A, Picard L, Dery M, Coenen K, Blondin P. 1999. The time interval between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. *Theriogenology* 51: 699-708.
- Sirard M A, Richard F, Blondin P, Robert C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65: 126-136.
- Sirard M A, Richard F, Mayes M. 1998. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: A review. *Theriogenology* 49: 483-497.
- Smidt D, Niemann H. 1999. Biotechnology in genetics and reproduction. *Livestock Production Science* 59: 207-221.
- Smith G D, Takayama S, Swain J E. 2012. Rethinking In Vitro Embryo Culture: New Developments in Culture Platforms and Potential to Improve Assisted Reproductive Technologies. *Biol Reprod* 86: 1-10.
- Snell W J, White J M. 1996. The Molecules of Mammalian Fertilization. *Cell* 85: 629-637.
- Snijders S, Dillon P, O'Callaghan D, Boland M. 2000. Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows. *Theriogenology* 53: 981-989.
- Snijders S E M, Dillon P G, O'Farrell K J, Diskin M, Wylie A R G, O'Callaghan D, Rath M, Boland M P. 2001. Genetic merit for milk production and reproductive success in dairy cows. *Animal Reproduction Science* 65: 17-31.
- Sordillo L M, Aitken S L. 2009. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 128: 104-109.
- Spicer L J, Echterkamp S E. 1986. Ovarian follicular growth, function and turnover in cattle: a review. *Journal of Animal Science* 62: 428-451.
- Spikings E C, Alderson J, St John J C. 2006. Transmission of mitochondrial DNA following assisted reproduction and nuclear transfer. *Human Reproduction Update* 12: 401-415.
- Spungin B, Breitbart H. 1996. Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. *J Cell Sci* 109: 1947-1955.
- Sreenan J. 1970. In vitro maturation and attempted fertilization of cattle follicular oocytes. *The Journal of Agricultural Science* 75: 393-396.
- Sreenan J, Scanlon P, Gordon I. 1968. Culture of fertilized cattle eggs. *The Journal of Agricultural Science* 70: 183-185.
- Sreenan J M. 1978. Non-surgical embryo transfer in the cow. *Theriogenology* 9: 69-83.
- Stauss C R, Votta T J, Suarez S S. 1995. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol Reprod* 53: 1280-1285.
- Steeves T E, Gardner D K. 1999a. 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.
- Steeves T E, Gardner D K. 1999b. Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. *Biol Reprod* 61: 731-740.

- Steeves T E, Gardner D K, Zuelke K A, Squires T S, Fry R C. 1999. In vitro development and nutrient uptake by embryos derived from oocytes of pre-pubertal and adult cows. *Molecular Reproduction and Development* 54: 49-56.
- Steptoe P C, Edwards R G. 1978. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 2: 366.
- Stitzel M L, Seydoux G. 2007. Regulation of the oocyte-to-zygote transition. *Science* 316: 407-408.
- Stoddart N R, Wild A E, Fleming T P. 1996. Stimulation of development in vitro by platelet-activating factor receptor ligands released by mouse preimplantation embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 108: 47-53.
- Stojkovic M, Kolle S, Peinl S, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Thompson J, Wenigerkind H, Reichenbach H, 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.
- Stokes P J, Abeydeera L R, Leese H J. 2005. Development of porcine embryos in vivo and in vitro; evidence for embryo 'cross talk' in vitro. *Dev Biol* 284: 62-71.
- Stricker S A. 1999. Comparative Biology of Calcium Signaling during Fertilization and Egg Activation in Animals. *Dev Biol* 211: 157-176.
- Stringfellow D A, Givens M D, Society I E T. 2010. Manual of the International Embryo Transfer Society: A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures. International Embryo Transfer Society, Savory, IL.
- Stroebech L, Mazzone G, Pedersen H S, Freude K K, Kadarmideen H N, Callesen H, Hyttel P. 2015. In vitro production of bovine embryos: revisiting oocyte development and application of systems biology. *Animal Reproduction* 12: 465-472.
- Sturmey R G, Bermejo-Alvarez P, Gutierrez-Adan A, Rizos D, Leese H J, Lonergan P. 2010. Amino acid metabolism of bovine blastocysts: a biomarker of sex and viability. *Molecular Reproduction and Development* 77: 285-296.
- Sturmey R G, Reis A, Leese H J, McEvoy T G. 2009. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reproduction in Domestic Animals* 44: 50-58.
- Suarez S S. 2008. Control of hyperactivation in sperm. *Human Reproduction Update* 14: 647-657.
- Suarez S S. 2015. Gamete and Zygote Transport. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. In: Plant T M, Zeleznik A J (Eds.). Academic Press. San Diego. pp. 197-232.
- Suarez S S, Ho H C. 2003. Hyperactivated motility in sperm. *Reproduction in Domestic Animals* 38: 119-124.
- Suarez S S, Katz D F, Owen D H, Andrew J B, Powell R L. 1991. Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol Reprod* 44: 375-381.
- Suarez S S, Varosi S M, Dai X. 1993. Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 4660-4664.
- Sudiman J, Sutton-McDowall M L, Ritter L J, White M A, Mottershead D G, Thompson J G, Gilchrist R B. 2014. Bone morphogenetic protein 15 in the pro-mature complex form enhances bovine oocyte developmental competence. *PLoS One* 9: 1-11.
- Sugimura S, Akai T, Hashiyada Y, Aikawa Y, Ohtake M, Matsuda H, Kobayashi S, Kobayashi E, Konishi K, Imai K. 2013. Effect of embryo density on in vitro development and gene expression in bovine in vitro-fertilized embryos cultured in a microwell system. *Journal of Reproduction and Development* 59: 115-122.
- Sugimura S, Akai T, Hashiyada Y, Somfai T, Inaba Y, Hirayama M, Yamanouchi T, Matsuda H, Kobayashi S, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi E, Konishi K, Imai K. 2012. Promising System for Selecting Healthy In Vitro Fertilized Embryos in Cattle. *PLoS One* 7: 1-13.

Sugimura S, Akai T, Somfai T, Hirayama M, Aikawa Y, Ohtake M, Hattori H, Kobayashi S, Hashiyada Y, Konishi K, Imai K. 2010. Time-Lapse Cinematography-Compatible Polystyrene-Based Microwell Culture System: A Novel Tool for Tracking the Development of Individual Bovine Embryos. *Biol Reprod* 83: 970-978.

Sugulle A H, Dochi O, Koyama H. 2008. Developmental Competence of Bovine Oocytes Selected by Brilliant Cresyl Blue Staining: Effect of the Presence of Corpus Luteum on Embryo Development. *Journal of Mammalian Ova Research* 25: 50-55.

Suh T K, Schenk J L. 2003. Pressure during flow sorting of bull sperm affects post-thaw motility characteristics. *Theriogenology* 59: 516-516.

Suh T K, Schenk J L, Seidel G E, Jr. 2005. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. *Theriogenology* 64: 1035-1048.

Sumantri C, Ooe M, Saha S, Boediono A. 1996. The influence of sperm-oocyte incubation time and breed of bull on in vitro embryo development in cattle. *Theriogenology* 45: 264.

Summers M C. 2013. A brief history of the development of the KSOM family of media. *J Assist Reprod Genet* 30: 995-999.

Summers M C, Biggers J D. 2003. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Human Reproduction Update* 9: 557-582.

Sun F, Bahat A, Gakamsky A, Girsh E, Katz N, Giojalas L C, Tur-Kaspa I, Eisenbach M. 2005. Human sperm chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cells secrete sperm chemoattractants. *Human Reproduction* 20: 761-767.

Sun Q Y. 2003. Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microsc Res Tech* 61: 342-348.

Sun Q Y, Miao Y L, Schatten H. 2009. Towards a new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. *Cell Cycle* 8: 2741-2747.

Sun Q Y, Schatten H. 2006. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction* 131: 193-205.

Sun Q Y, Wu G M, Lai L, Bonk A, Cabot R, Park K W, Day B N, Prather R S, Schatten H. 2002. Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation, microtubule organization, chromatin behavior, and cell cycle progression by protein phosphatases during pig oocyte maturation and fertilization in vitro. *Biol Reprod* 66: 580-588.

Sung L Y, Du F, Xu J, Chang W, Nedambale T L, Zhang J, Jiang S, Tian X C, Yang X. 2004. The differential requirement of albumin and sodium citrate on the development of in vitro produced bovine embryos. *Reproduction Nutrition Development* 44: 551-564.

Sutovsky P, Schatten G. 1997. Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization. *Biol Reprod* 56: 1503-1512.

Sutton-McDowall M L, Gilchrist R B, Thompson J G. 2004. Cumulus expansion and glucose utilisation by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. *Reproduction* 128: 313-319.

Sutton-McDowall M L, Gilchrist R B, Thompson J G. 2010. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction* 139: 685-695.

Sutton M L, Gilchrist R B, Thompson J G. 2003. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction Update* 9: 35-48.

Suzuki H, Foote R H. 1995. Bovine oviductal epithelial cells (BOEC) and oviducts: I. For embryo culture. II. Using SEM for studying interactions with spermatozoa. *Microsc Res Tech* 31: 519-530.

Suzuki H, Saito Y, Kagawa N, Yang X. 2003. In vitro fertilization and polyspermy in the pig: factors affecting fertilization rates and cytoskeletal reorganization of the oocyte. *Microsc Res Tech* 61: 327-334.

Suzuki K, Ebihara M, Nagai T, Clarke N G, Harrison R A. 1994. Importance of bicarbonate/CO₂ for fertilization of pig oocytes in vitro, and synergism with caffeine. *Reproduction, Fertility and Development* 6: 221-227.

Swain J E. 2010. Optimizing the culture environment in the IVF laboratory: impact of pH and buffer capacity on gamete and embryo quality. *Reprod Biomed Online* 21: 6-16.

Swain J E, Smith G D. 2011. Advances in embryo culture platforms: novel approaches to improve preimplantation embryo development through modifications of the microenvironment. *Human Reproduction Update* 17: 541-557.

Swann K, Parrington J. 1999. Mechanism of Ca²⁺ release at fertilization in mammals. *Journal of Experimental Zoology* 285: 267-275.

Tadros W, Lipshitz H D. 2009. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development* 136: 3033-3042.

Tajik P, Niwa K. 1998. Effects of caffeine and/or heparin in a chemically defined medium with or without glucose on in vitro penetration of bovine oocytes and their subsequent development. *Theriogenology* 49: 771-777.

Tajik P, Niwa K, Murase T. 1993. Effects of different protein supplements in fertilization medium on in vitro penetration of cumulus-intact and cumulus-free bovine oocytes matured in culture. *Theriogenology* 40: 949-958.

Tajik P, Wang W H, Okuda K, Niwa K. 1994. In vitro fertilization of bovine oocytes in a chemically defined, protein-free medium varying the bicarbonate concentration. *Biol Reprod* 50: 1231-1237.

Takagi Y, Mori K, Takahashi T, Sugawara S, Masaki J. 1992. Differences in development of bovine oocytes recovered by aspiration or by mincing. *Journal of Animal Science* 70: 1923-1937.

Takahashi M. 2012. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *Journal of Reproduction and Development* 58: 1-9.

Takahashi M, Keicho K, Takahashi H, Ogawa H, Schulte R, Okano A. 2000. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured bovine embryos by comet assay. *Theriogenology* 54: 137-145.

Takahashi Y, First N L. 1992. In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37: 963-978.

Takahashi Y, First N L. 1993. In vitro fertilization of bovine oocytes in the presence of theophylline. *Animal Reproduction Science* 34: 1-18.

Takahashi Y, Hishinuma M, Matsui M, Tanaka H, Kanagawa H. 1996. Development of In Vitro Matured/Fertilized Bovine Embryos in a Chemically Defined Medium: Influence of Oxygen Concentration in the Gas Atmosphere. *Journal of Veterinary Medical Science* 58: 897-902.

Takahashi Y, Kanagawa H. 1998. Effect of oxygen concentration in the gas atmosphere during in vitro insemination of bovine oocytes on the subsequent embryonic development in vitro. *Journal of Veterinary Medical Science* 60: 365-367.

Talbot P, Shur B D, Myles D G. 2003. Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biol Reprod* 68: 1-9.

Tan J H, Wang H L, Sun X S, Liu Y, Sui H S, Zhang J. 2009. Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. *Mol Hum Reprod* 15: 1-9.

Taneja M, Bols P E J, de Velde A V, Ju J-C, Schreiber D, Tripp M W, 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. *Biol Reprod* 62: 206-213.

Tanghe S, Van Soom A, Mehrzad J, Maes D, Duchateau L, de Kruif A. 2003. Cumulus contributions during bovine fertilization in vitro. *Theriogenology* 60: 135-149.

Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A. 2002. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development* 61: 414-424.

- Tanghe S, Van Soom A, Talebkhan Garoussi M, Mintiens K, de Kruif A. 2000. Sperm-egg ratios above 5000: 1 do not improve in vitro fertilization rates in the bovine. *Journal of Reproduction and Fertility* 25: 91.
- Tao T, Robichaud A, Mercier J, Ouellette R. 2013. Influence of group embryo culture strategies on the blastocyst development and pregnancy outcome. *J Assist Reprod Genet* 30: 63-68.
- Tarin J J. 1996. Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos. *Mol Hum Reprod* 2: 717-724.
- Tatemoto H, Sakurai N, Muto N. 2000. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of cumulus cells. *Biol Reprod* 63: 805-810.
- Tatone C, Amicarelli F, Carbone M C, Monteleone P, Caserta D, Marci R, Artini P G, Piomboni P, Focarelli R. 2008. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Human Reproduction Update* 14: 131-142.
- Team R D C. 2015: R: A language and environment for statistical computing. 3.2.3 edn. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Tervit H, Cooper M, Goold P G, Haszard G. 1980. Non-surgical embryo transfer in cattle. *Theriogenology* 13: 63-71.
- Tervit H R, Pugh P A. The effects of sperm and pyruvate concentration during IVF on the subsequent development and quality of bovine embryos. 14th International Congress on Animal Reproduction (ICAR). Stockholm, Sweden 2000. p. 211.
- Tervit H R, Pugh P A, McGowan L T, Bell A C S, Wells R W. 1994. The Freezability of sheep embryos is affected by culture system and source (in vivo or in vitro derived). *Theriogenology* 41: 315.
- Tervit H R, Whittingham D G, Rowson L E. 1972a. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *Journal of Reproduction and Fertility* 30: 493-497.
- Tervit H R, Whittingham D G, Rowson L E. 1972b. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil* 30: 493-497.
- Therien I, Bergeron A, Bousquet D, Manjunath P. 2005. Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. *Molecular Reproduction and Development* 71: 97-106.
- Therien I, Bousquet D, Manjunath P. 2001. Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation. *Biol Reprod* 65: 41-51.
- Therien I, Moreau R, Manjunath P. 1999. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 61: 590-598.
- Thibault C, Szollosi D, Gerard M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reproduction Nutrition and Development* 27: 865-896.
- Thibodeaux J, Myers M, Hansel W. 1995a. The beneficial effects of incubating bovine embryos in groups are due to platelet-derived growth factor. *Theriogenology* 1: 336.
- Thibodeaux J K, Myers M W, Prough S G, White K L. 1995b. Effect of a serum extender containing growth factors on development of IVM and IVF bovine embryos. *Theriogenology* 44: 423-432.
- Thomas R E, Armstrong D T, Gilchrist R B. 2002. Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation. *Dev Biol* 244: 215-225.
- Thomas R E, Armstrong D T, Gilchrist R B. 2004. Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate levels. *Biol Reprod* 70: 548-556.
- Thompson J G. 1996. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology* 45: 27-40.
- Thompson J G. 1997. Comparison between in vivo-derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reproduction, Fertility and Development* 9: 341-354.

- Thompson J G. 2000. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. *Animal Reproduction Science* 60-61: 263-275.
- Thompson J G. 2006. The impact of nutrition of the cumulus oocyte complex and embryo on subsequent development in ruminants. *Journal of Reproduction and Development* 52: 169-175.
- Thompson J G, Allen N W, McGowan L T, Bell A C, Lambert M G, Tervit H R. 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.
- Thompson J G, Brown H M, Kind K L, Russell D L. 2015. The Ovarian Antral Follicle: Living on the Edge of Hypoxia or Not? *Biol Reprod* 92: 1-6.
- Thompson J G, Duganzich D. 1996. Analysis of culture systems for bovine in vitro embryo production reported in abstracts of the proceedings of the International Embryo Transfer Society (1991-1995). *Theriogenology* 45: 195.
- Thompson J G, Gardner D K, Pugh P A, McMillan W H, Tervit H R. 1995. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. *Biol Reprod* 53: 1385-1391.
- Thompson J G, McNaughton C, Gasparrini B, McGowan L T, Tervit H R. 2000. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 118: 47-55.
- Thompson J G, Mitchell M, Kind K L. 2007. Embryo culture and long-term consequences. *Reproduction, Fertility and Development* 19: 43-52.
- Thompson J G, Partridge R J, Houghton F D, Cox C I, Leese H J. 1996. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 106: 299-306.
- Thompson J G, Peterson A J. 2000. Bovine embryo culture in vitro: new developments and post-transfer consequences. *Human Reproduction* 15: 59-67.
- Thompson J G, Simpson A C, Pugh P A, Donnelly P E, Tervit H R. 1990. Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 89: 573-578.
- Thompson J G, Simpson A C, Pugh P A, Tervit H R. 1992. Requirement for glucose during in vitro culture of sheep preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development* 31: 253-257.
- Thys M, Vandaele L, Morrell J M, Mestach J, Van Soom A, Hoogewijs M, Rodriguez-Martinez H. 2009. In vitro fertilizing capacity of frozen-thawed bull spermatozoa selected by single-layer (glycidoxypropyltrimethoxysilane) silane-coated silica colloidal centrifugation. *Reproduction in Domestic Animals* 44: 390-394.
- Tkach M, Thery C. 2016. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* 164: 1226-1232.
- Tomek W, Melo Sterza F A, Kubelka M, Wollenhaupt K, Torner H, Anger M, Kanitz W. 2002. Regulation of translation during in vitro maturation of bovine oocytes: the role of MAP kinase, eIF4E (cap binding protein) phosphorylation, and eIF4E-BP1. *Biol Reprod* 66: 1274-1282.
- Töpfer-Petersen E, Petrounkina A M, Ekhlesi-Hundrieser M. 2000. Oocyte-sperm interactions. *Animal Reproduction Science* 60-61: 653-662.
- Toshimori K, Eddy E M. 2015. The Spermatozoon. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. In: Plant T M, Zeleznik A J (Eds.). Academic Press. San Diego. pp. 99-148.
- Tosti E. 2006. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4: 1-9.
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara M A, Nilsa R D, Huang P. 2008. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* 10: 1343-1374.
- Trigal B, Gomez E, Caamaño J N, Munoz M, Moreno J, Carrocera S, Martin D, Diez C. 2012. In vitro and in vivo quality of bovine embryos in vitro produced with sex-sorted sperm. *Theriogenology* 78: 1465-1475.

Trigal B, Gomez E, Diez C, Caamaño J N, Martin D, Carrocera S, Munoz M. 2011. In vitro development of bovine embryos cultured with activin A. *Theriogenology* 75: 584-588.

Tripathi A, Kumar K V, Chaube S K. 2010. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. *J Cell Physiol* 223: 592-600.

Trounson A, Anderiesz C, Jones G M, Kausche A, Lolatgis N, Wood C. 1998. Oocyte maturation. *Human Reproduction* 13: 52-62.

Trounson A, Pushett D, Maclellan L, Lewis I, Gardner D. 1994. Current status of IVM/IVF and embryo culture in humans and farm animals. *Theriogenology* 41: 57-66.

Tsaadon A, Eliyahu E, Shtraizent N, Shalgi R. 2006. When a sperm meets an egg: block to polyspermy. *Mol Cell Endocrinol* 252: 107-114.

Tsunoda S, Kimura N, Fujii J. 2013. Oxidative stress and redox regulation of gametogenesis, fertilization, and embryonic development. *Reproductive Medicine and Biology*: 1-9.

Tulsiani D R P, Abou-Haila A. 2012. Biological Processes that Prepare Mammalian Spermatozoa to Interact with an Egg and Fertilize It. *Scientifica* 2012: 1-12.

Turner R M. 2006. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, Fertility and Development* 18: 25-38.

Ulbrich S E, Zitta K, Hiendleder S, Wolf E. 2010. In vitro systems for intercepting early embryo-maternal cross-talk in the bovine oviduct. *Theriogenology* 73: 802-816.

Ulloa S M, Heinzmann J, Herrmann D, Timmermann B, Baulain U, Grossfeld R, Diederich M, Lucas-Hahn A, Niemann H. 2015. Effects of different oocyte retrieval and in vitro maturation systems on bovine embryo development and quality. *Zygote* 23: 367-377.

Upreti G C, Riches P C, Johnson L A. 1988. Attempted sexing of bovine spermatozoa by fractionation on a Percoll density gradient. *Gamete Res* 20: 83-92.

Urman B, Balaban B. 2005. Is there still a place for co-cultures in the era of sequential media? *Reprod Biomed Online* 10: 492-496.

Urner F, Sakkas D. 1996. Glucose participates in sperm-oocyte fusion in the mouse. *Biol Reprod* 55: 917-922.

Urrego R, Rodriguez-Osorio N, Niemann H. 2014. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. *Epigenetics* 9: 803-815.

Ushijima H, Akiyama K, Tajima T. 2008. Transition of cell numbers in bovine preimplantation embryos: in vivo collected and in vitro produced embryos. *Journal of Reproduction and Development* 54: 239-243.

Uyar A, Seli E. 2014. Metabolomic assessment of embryo viability. *Semin Reprod Med* 32: 141-152.

Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. 1996. Overall efficiency of in vitro embryo production and vitrification in cattle. *Theriogenology* 45: 683-689.

Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. 1997. The submarine incubation system, a new tool for in vitro embryo culture: A technique report. *Theriogenology* 48: 1379-1385.

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth P J, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. 1998. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development* 51: 53-58.

Vajta G, Korosi T, Du Y, Nakata K, Ieda S, Kuwayama M, Nagy Z P. 2008. The Well-of-the-Well system: an efficient approach to improve embryo development. *Reprod Biomed Online* 17: 73-81.

Vajta G, Kuwayama M. 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 65: 236-244.

Vajta G, Nagy Z P. 2006. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online* 12: 779-796.

Vajta G, Peura T T, Holm P, Paldi A, Greve T, Trounson A O, Callesen H. 2000. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. *Molecular Reproduction and Development* 55: 256-264.

- Vajta G, Rienzi L, Cobo A, Yovich J. 2010. Embryo culture: can we perform better than nature? *Reprod Biomed Online* 20: 453-469.
- Valli H, Phillips B T, Orwig K E, Gassei K, Nagano M C. 2015. Spermatogonial Stem Cells and Spermatogenesis. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. In: Zeleznik A J (Ed.). Academic Press. San Diego. pp. 595-635.
- van den Hurk R, Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63: 1717-1751.
- van der Ven H H, Al-Hasani S, Diedrich K, Hamerich U, Lehmann F, Krebs D. 1985. Polyspermy in in vitro fertilization of human oocytes: frequency and possible causes. *Ann N Y Acad Sci* 442: 88-95.
- Van der Zwalm P, Bertin G, Schoysman-Deboeck A, Geerts L, Schoysman R, Debauche C. 1989. Techniques of sperm selection, improvement and separation in an in vitro fertilization program. *Acta Eur Fertil* 20: 269-283.
- Van Hoeck V, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Pintelon I, Jorssen E, Dufort I, Sirard M A, Verlaet A, Hermans N, Bols P E, Leroy J L. 2015. Interaction between differential gene expression profile and phenotype in bovine blastocysts originating from oocytes exposed to elevated non-esterified fatty acid concentrations. *Reproduction, Fertility and Development* 27: 372-384.
- van Inzen W G, van Stekelenburg-Hamers A E, Weima S M, Kruip T A, Bevers M M, Mummery C L. 1995. Culture of bovine embryos to the blastocyst stage using Buffalo rat liver (BRL) cells. *Theriogenology* 43: 723-738.
- Van Langendonck A, Donnay I, Schurbiers N, Auquier P, Carolan C, Massip A, Dessy F. 1997. Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. *Journal of Reproduction and Fertility* 109: 87-93.
- van Munster E B, Stap J, Hoebe R A, te Meerman G J, Aten J A. 1999. Difference in sperm head volume as a theoretical basis for sorting X- and Y-bearing spermatozoa: Potentials and limitations. *Theriogenology* 52: 1281-1293.
- Van Soom A, Boerjan M L, Bols P E, Vanroose G, Lein A, Coryn M, de Kruif A. 1997a. Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced in vivo after superovulation. *Biol Reprod* 57: 1041-1049.
- Van Soom A, de Kruif A. 1996. Oocyte Maturation, Sperm Capacitation and Pre-implantation Development in the Bovine: Implications for in vitro Production of Embryos. *Reproduction in Domestic Animals* 31: 687-701.
- Van Soom A, Tanghe S, De Pauw I, Maes D, de Kruif A. 2002. Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reproduction in Domestic Animals* 37: 144-151.
- Van Soom A, Van Vlaenderen I, Mahmoudzadeh A R, Deluyker H, de Kruif A. 1992. Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology* 38: 905-919.
- Van Soom A, Ysebaert M T, de Kruif A. 1997b. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* 47: 47-56.
- van Tol H T, van Eijk M J, Mummery C L, van den Hurk R, Bevers M M. 1996. Influence of FSH and hCG on the resumption of meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. *Molecular Reproduction and Development* 45: 218-224.
- van Wagtenonk-de Leeuw A M, Aerts B J, den Daas J H. 1998. Abnormal offspring following in vitro production of bovine preimplantation embryos: a field study. *Theriogenology* 49: 883-894.
- van Wagtenonk-de Leeuw A M, de Ruigh L. 1999. Increased oocyte and embryo yield upon FSH stimulation prior to OPU. *Theriogenology* 51: 436.
- Van Winkle L J. 2001. Amino acid transport regulation and early embryo development. *Biol Reprod* 64: 1-12.
- Vegetti W, Alagna F. 2006. FSH and folliculogenesis: from physiology to ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online* 12: 684-694.

- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57: 149-179.
- Veznik Z, Svecova D, Zajicova A, Reckova Z, Rubes J. 2007. The interrelationship between quality parameters of sperm before and after separation by gradient centrifugation. *Veterinarni Medicina* 52: 423.
- Vigneron C, Perreau C, Dupont J, Uzbekova S, Prigent C, Mermillod P. 2004. Several signaling pathways are involved in the control of cattle oocyte maturation. *Molecular Reproduction and Development* 69: 466-474.
- Visconti P E, Galantino-Homer H, Moore G D, Bailey J L, Ning X, Fornes M, Kopf G S. 1998. The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl* 19: 242-248.
- Visconti P E, Kopf G S. 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 59: 1-6.
- Visconti P E, Krapf D, de la Vega-Beltran J L, Acevedo J J, Darszon A. 2011. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl* 13: 395-405.
- Vishwanath R, Shannon P. 1997. Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. *Reproduction, Fertility and Development* 9: 321-331.
- Voelkel S A, Hu Y X. 1992. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. *Theriogenology* 37: 1117-1131.
- Vogl A W, Vaid K S, Guttman J A. 2008. The Sertoli Cell Cytoskeleton. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. In: Cheng C Y (Ed.). Springer New York. New York, NY. pp. 186-211.
- Vos P L A M, Hendriksen P J M, Dieleman S J. 1999. IVP results of oocytes from eCG-stimulated bovine follicles at the time of the preovulatory LH surge are severely affected by the system of aspiration. *Theriogenology* 51: 310.
- Vozzi C, Formenton A, Chanson A, Senn A, Sahli R, Shaw P, Nicod P, Germond M, Haefliger J A. 2001. Involvement of connexin 43 in meiotic maturation of bovine oocytes. *Reproduction* 122: 619-628.
- Vredenburg-Wilberg W L, Parrish J J. 1995. Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Molecular Reproduction and Development* 40: 490-502.
- Wakai T, Vanderheyden V, Fissore R A. 2011. Ca²⁺ signaling during mammalian fertilization: requirements, players, and adaptations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: 1-25.
- Wale P L, Gardner D K. 2016. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Human Reproduction Update* 22: 2-22.
- Walker S K, Hartwich K M, Seamark R F. 1996. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: Concepts and challenges. *Theriogenology* 45: 111-120.
- Walters A H, Pryor A W, Bailey T L, Pearson R E, Gwazdauskas F C. 2002. Milk yield, energy balance, hormone, follicular and oocyte measures in early and mid-lactation Holstein cows. *Theriogenology* 57: 949-961.
- Walters A H, Saacke R G, Pearson R E, Gwazdauskas F C. 2006. Assessment of pronuclear formation following in vitro fertilization with bovine spermatozoa obtained after thermal insulation of the testis. *Theriogenology* 65: 1016-1028.
- Wang Q, Sun Q Y. 2007. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. *Reproduction, Fertility and Development* 19: 1-12.
- Wang S, Liu Y, Holyoak G R, Bunch T D. 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.
- Wang W H, Day B N, Wu G M. 2003. How does polyspermy happen in mammalian oocytes? *Microsc Res Tech* 61: 335-341.
- Wang Y S, Zhao X, Su J M, An Z X, Xiong X R, Wang L J, Liu J, Quan F S, Hua S, Zhang Y. 2011. Lowering storage temperature during ovary transport is beneficial to the developmental

competence of bovine oocytes used for somatic cell nuclear transfer. *Animal Reproduction Science* 124: 48-54.

Wang Z, Yu S, Xu Z. 2007. Effects of Collection Methods on Recovery Efficiency, Maturation Rate and Subsequent Embryonic Developmental Competence of Oocytes in Holstein Cow. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 20: 496-500.

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.

Ward F, Rizos D, Corridan D, Quinn K, Boland M, Lonergan P. 2001. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. *Molecular Reproduction and Development* 60: 47-55.

Ward F A, Enright B P, Boland M P. 2000a. Effect of group size and oocyte to medium volume post-fertilization on the development of bovine embryos in vitro. *Theriogenology* 53: 306.

Ward F A, Lonergan P, Enright B P, Boland M P. 2000b. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. *Theriogenology* 54: 433-446.

Wassarman P M. 1987. Early Events in Mammalian Fertilization. *Annual Review of Cell Biology* 3: 109-142.

Wassarman P M. 1994. Gamete interactions during mammalian fertilization. *Theriogenology* 41: 31-44.

Wassarman P M. 1999. Mammalian Fertilization: Molecular Aspects of Gamete Adhesion, Exocytosis, and Fusion. *Cell* 96: 175-183.

Wassarman P M, Jovine L, Litscher E S. 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nature cell biology* 3: E59-E64.

Wassarman P M, Jovine L, Litscher E S, Qi H, Williams Z. 2004. Egg-sperm interactions at fertilization in mammals. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 115: S57-S60.

Wassarman P M, Jovine L, Qi H, Williams Z, Darie C, Litscher E S. 2005. Recent aspects of mammalian fertilization research. *Mol Cell Endocrinol* 234: 95-103.

Wasserman W J, Masui Y. 1976. A cytoplasmic factor promoting oocyte maturation: its extraction and preliminary characterization. *Science* 191: 1266-1268.

Wathes D C, Fenwick M, Cheng Z, Bourne N, Llewellyn S, Morris D G, Kenny D, Murphy J, Fitzpatrick R. 2007. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology* 68: S232-S341.

Watson A J. 2007. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *Journal of Animal Science* 85: E1-E3.

Watson A J, Barcroft L C. 2001. Regulation of blastocyst formation. *Frontiers in Bioscience* 6: D708-D730.

Watson P F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60-61: 481-492.

Webb R, Garnsworthy P, Gong J-G, Armstrong D. 2004. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science* 82: E63-E74.

Webb R, Gong J G, Law A S, Rusbridge S M. 1992. Control of ovarian function in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 45: 141-156.

Wei Y-H, Lee H-C. 2002. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med (Maywood)* 227: 671-682.

Weigel K A. 2004. Exploring the Role of Sexed Semen in Dairy Production Systems. *Journal of Dairy Science* 87: E120-E130.

Welch G R, Johnson L A. 1999. Sex preselection: laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X- and Y-sperm by sort reanalysis for DNA. *Theriogenology* 52: 1343-1352.

- Wertheimer E, Krapf D, de la Vega-Beltran J L, Sanchez-Cardenas C, Navarrete F, Haddad D, Escoffier J, Salicioni A M, Levin L R, Buck J, Mager J, Darszon A, Visconti P E. 2013. Compartmentalization of distinct cAMP signaling pathways in mammalian sperm. *Journal of Biological Chemistry* 288: 35307-35320.
- Wheeler M B, Rutledge J J, Fischer-Brown A, VanEtten T, Malusky S, Beebe D J. 2006. Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. *Theriogenology* 65: 219-227.
- Whitaker M. 2006. Calcium at fertilization and in early development. *Physiological Reviews* 86: 25-88.
- Whitaker M. 2008. Calcium signalling in early embryos. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences* 363: 1401-1418.
- White-Cooper H, Doggett K, Ellis R E. 2009. The evolution of spermatogenesis. *Sperm Biology*. In: Birkhead T R, David J Hosken D J, Pitnick S (Eds.). Academic Press. London. pp. 151-183.
- Whitesides G M. 2006. The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442: 368-373.
- Whitten W K. 1956. Culture of tubal mouse ova. *Nature* 177: 96-97.
- Wiesner B, Weiner J, Middendorff R, Hagen V, Kaupp U B, Weyand I. 1998. Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca²⁺ entry into sperm. *J Cell Biol* 142: 473-484.
- Wiley L M, Yamami S, Van Muyden D. 1986. Effect of potassium concentration, type of protein supplement, and embryo density on mouse preimplantation development in vitro. *Fertil Steril* 45: 111-119.
- Wilmot I, Beaujean N, de Sousa P A, Dinnyes A, King T J, Paterson L A, Wells D N, Young L E. 2002. Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 419: 583-587.
- Wilmot I, Schnieke A E, McWhir J, Kind A J, Campbell K H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813.
- Wilson R D, Fricke P M, Leibfried-Rutledge M L, Rutledge J J, Penfield C M S, Weigel K A. 2006. In vitro production of bovine embryos using sex-sorted sperm. *Theriogenology* 65: 1007-1015.
- Wilson R D, Weigel K A, Fricke P M, Rutledge J J, Leibfried-Rutledge M L, Matthews D L, Schutkus V R. 2005. In Vitro Production of Holstein Embryos Using Sex-Sorted Sperm and Oocytes from Selected Cull Cows. *Journal of Dairy Science* 88: 776-782.
- Willetts E L, Black W G, Casida L E, Stone W H, Buckner P J. 1951. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science* 113: 247.
- Williams C J. 2002. Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Human Reproduction Update* 8: 313-321.
- Wise T, Suss U, Stranzinger G, Wuthrich K, Maurer R R. 1994. Cumulus and oocyte maturation and in vitro and in vivo fertilization of oocytes in relation to follicular steroids, prolactin, and glycosaminoglycans throughout the estrous period in superovulated heifers with a normal LH surge, no detectable LH surge, and progestin inhibition of LH surge. *Domest Anim Endocrinol* 11: 59-86.
- Wolf C, Brass K, Rubin M, Pozzobon S, Mozzaquatro F, De La Corte F. 2008. The effect of sperm selection by Percoll or swim-up on the sex ratio of in vitro produced bovine embryos. *Animal Reproduction* 5: 110-115.
- World H O T F o M f t D o t F P, Special Programme of Research D, Research Training in Human R. 1980. Temporal relationships between ovulation and defined changes in the concentration of plasma estradiol-17 β , luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and progesterone: I. Probit analysis. *Am J Obstet Gynecol* 138: 383-390.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath J W, Niemann H. 1996. Expression of the gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Journal of Reproduction and Fertility* 108: 17-24.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Lemme E, Korsawe K, Niemann H. 2004. Gene expression patterns in in vitro-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? *Animal Reproduction Science* 82-83: 593-603.

- Wrenzycki C, Herrmann D, Niemann H. 2007. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology* 68: S77-S83.
- Wright R W, Jr., Bondioli K R. 1981. Aspects of in vitro fertilization and embryo culture in domestic animals. *Journal of Animal Science* 53: 702-729.
- Wright R W, Jr., Ellington J. 1995. Morphological and physiological differences between in vivo- and in vitro-produced preimplantation embryos from livestock species. *Theriogenology* 44: 1167-1189.
- Wu B, Ignatz G, Currie W B, Yang X. 1997. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 56: 253-259.
- Wu J, Xu B, Wang W. 2007. Effects of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone on the developmental competence of porcine preantral follicle oocytes grown in vitro. *J Assist Reprod Genet* 24: 419-424.
- Wydooghe E, Vandaele L, Piepers S, Dewulf J, Van den Abbeel E, De Sutter P, Van Soom A. 2014. Individual commitment to a group effect: strengths and weaknesses of bovine embryo group culture. *Reproduction* 148: 519-529.
- Xu J, Chaubal S A, Du F. 2009. Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. *Theriogenology* 71: 39-47.
- Xu J, Guo Z, Su L, Nedambale T L, Zhang J, Schenk J, Moreno J F, Dinnyes A, Ji W, Tian X C, Yang X, Du F. 2006. Developmental potential of vitrified holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex-sorted sperm. *Journal of Dairy Science* 89: 2510-2518.
- Xu K P, Greve T, Callesen H, Hyttel P. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 81: 501-504.
- Yabuuchi A, Beyhan Z, Kagawa N, Mori C, Ezo K, Kato K, Aono F, Takehara Y, Kato O. 2012. Prevention of mitochondrial disease inheritance by assisted reproductive technologies: prospects and challenges. *Biochim Biophys Acta* 1820: 637-642.
- Yan J, Feng H L, Chen Z J, Hu J, Gao X, Qin Y. 2006. Influence of swim-up time on the ratio of X- and Y-bearing spermatozoa. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 129: 150-154.
- Yan J, Yang Y, Liying Y, Zichuan L, Ping L, Huailiang F, Qi Z, Jie Q. 2011. In vitro maturation of cumulus-partially enclosed immature human oocytes by priming with gonadotropin. *Fertil Steril* 96: 629-634.
- Yanagimachi R. 1969a. In vitro acrosome reaction and capacitation of golden hamster spermatozoa by bovine follicular fluid and its fractions. *Journal of Experimental Zoology* 170: 269-280.
- Yanagimachi R. 1969b. In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *Journal of Reproduction and Fertility* 18: 275-286.
- Yanagimachi R. 1970. The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *Journal of Reproduction and Fertility* 23: 193-196.
- Yanagimachi R. 1981. Mechanisms of Fertilization in Mammals. *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*. In: Mastroianni L, Jr., Biggers J (Eds.). Springer US. pp. 81-182.
- Yanagimachi R. 1989. Sperm capacitation and gamete interaction. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 38: 27-33.
- Yanagimachi R. 1994a. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 2: 371-372.
- Yanagimachi R. 1994b. Mammalian fertilization. *Physiology of Reproduction*. In: Knobil E, Neil J D (Eds.). Raven Press. New York, USA. pp. 189-317.
- Yanagimachi R. 1994c. Mammalian fertilization. *The physiology of reproduction*. In: Knobil E, Neill J D (Eds.). Raven Press, New York. pp. 189-317.
- Yanagimachi R. 2011. Mammalian Sperm Acrosome Reaction: Where Does It Begin Before Fertilization? *Biol Reprod* 85: 4-5.
- Yanagimachi R, Chang M. 1963. Sperm ascent through the oviduct of the hamster and rabbit in relation to the time of ovulation. *Journal of Reproduction and Fertility* 6: 413-420.

- Yang B K, Yang X, Foote R H. 1994. Early Development of IVM/IVF Bovine Embryos Cultured with or without Somatic Cells in a Simple Serum-free Medium with Different Concentrations of CO₂ and O₂. *The Japanese journal of animal reproduction* 40: 197-205.
- Yang C-H, Yanagimachi R. 1989. Differences between mature ovarian and oviductal oocytes: a study using the golden hamster. *Human Reproduction* 4: 63-71.
- Yang N S, Lu K H, Gordon I. 1990. In vitro fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. *Theriogenology* 33: 352.
- Yang W C, Sang L, Xiao Y, Zhang H L, Tang K Q, Yang L G. 2014. Tentative identification of sex-specific antibodies and their application for screening bovine sperm proteins for sex-specificity. *Mol Biol Rep* 41: 217-223.
- Yang X, Kubota C, Suzuki H, Taneja M, Bols P E, Presicce G A. 1998. Control of oocyte maturation in cows - Biological factors. *Theriogenology* 49: 471-482.
- Ye J, Campbell K H, Craigon J, Luck M R. 2005. Dynamic changes in meiotic progression and improvement of developmental competence of pig oocytes in vitro by follicle-stimulating hormone and cycloheximide. *Biol Reprod* 72: 399-406.
- Yoshioka K, Othman A M, Taniguchi T, Yamanaka H, Sekikawa K. 1997. Differential patterns of blastulation in bovine morulae cultured in synthetic oviduct fluid medium containing FCS or BSA. *Theriogenology* 48: 997-1006.
- Young L E, Sinclair K D, Wilmut I. 1998. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* 3: 155-163.
- Younis A I, Brackett B G, Fayrer-Hosken R A. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Res* 23: 189-201.
- Yu S, Wan K T, Roberts K P, Bischof J C, Nelson B J. 2003. Mechanical property characterization of mouse zona pellucida. *IEEE Transactions on NanoBioscience* 2: 279-286.
- Yuan Y, Van Soom A, Laevens H, Coopman F, Peelman L, de Kruif A. 2000. Single embryo culture affects hatching rate in bovine in vitro-produced embryos. *Theriogenology* 53: 307.
- Yuzpe A A, Brown S E, Casper R F, Nisker J, Graves G, Shatford L. 1989. Transvaginal, ultrasound-guided oocyte retrieval for in vitro fertilization. *Journal of Reproductive Medicine* 34: 937-942.
- Zafeiriou S, Loutradis D, Michalas S. 2000. The role of gonadotropins in follicular development and their use in ovulation induction protocols for assisted reproduction. *European Journal of Contraception & Reproductive Health Care* 5: 157-167.
- Zander-Fox D, Lane M. 2012. Media Composition: Energy Sources and Metabolism. *Embryo Culture: Methods and Protocols*. In: Smith D G, Swain E J, Pool B T (Eds.). Humana Press. Totowa, NJ. pp. 81-96.
- Zaneveld L J D, Jonge C J. 1991. Mammalian Sperm Acrosomal Enzymes and the Acrosome Reaction. *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization*. In: Dunbar B S, O'Rand M G (Eds.). Springer US. Boston, MA. pp. 63-79.
- Zarcula S M, Cernescu H, Godja G, Igna V. 2012: Effects of recovering bovine oocyte methods on quantity and quality of cumulus-oocyte complexes. *Advanced Research in Scientific Areas*. Vol. 1. EDIS - Publishing Institution of the University of Zilina. Slovakia. pp. 2171-2173.
- Zavos P. 1992. Preparation of human frozen-thawed seminal specimens using the SpermPrep filtration method: improvements over the conventional swim-up method. *Fertil Steril* 57: 1326-1330.
- Zeleznik A J. 2004. The physiology of follicle selection. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2: 1-7.
- Zeron Y, Pearl M, Borochoy A, Arav A. 1999. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. *Cryobiology* 38: 35-42.
- Zhang K, Hansen P J, Ealy A D. 2010. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro. *Reproduction* 140: 815-826.
- Zhang K, Smith G W. 2015. Maternal control of early embryogenesis in mammals. *Reproduction, Fertility and Development* 27: 880-896.

- Zhang L, Denniston R S, Godke R A. 1992. A simple method for in vitro maturation, in vitro fertilization, and co-culture of bovine oocytes. *Journal of tissue culture methods* 14: 107-112.
- Zhang L, Jiang S, Wozniak P J, Yang X, Godke R A. 1995. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 40: 338-344.
- Zhang M, Lu K H, Seidel G E, Jr. 2003. Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. *Theriogenology* 60: 1657-1663.
- Zhang M, Ouyang H, Xia G. 2009. The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Mol Hum Reprod* 15: 399-409.
- Zhang M, Xia G. 2012. Hormonal control of mammalian oocyte meiosis at diplotene stage. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69: 1279-1288.
- Zhang M, Xia G, Zhou B, Wang C. 2007. Gonadotropin-controlled mammal oocyte meiotic resumption. *Frontiers in Bioscience* 12: 282-296.
- Zhang X, Li X-H, Ma X, Wang Z-H, Lu S, Guo Y-L. 2006. Redox-induced apoptosis of human oocytes in resting follicles in vitro. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 13: 451-458.
- Zuelke K A, Brackett B G. 1990. Luteinizing hormone-enhanced in vitro maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. *Biol Reprod* 43: 784-787.
- Zuelke K A, Brackett B G. 1993. Increased glutamine metabolism in bovine cumulus cell-enclosed and denuded oocytes after in vitro maturation with luteinizing hormone. *Biol Reprod* 48: 815-820.