

# COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE INCUBACIÓN SOBRE LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OOCITOS BOVINOS

Neil Vásquez A.<sup>1</sup>, Jorge E. Gómez O.<sup>2</sup>, Juan C. Álvarez B.<sup>3</sup>, Natalia A. Chavarría<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Neil Vásquez Araque. Biólogo, M.Sc en Endocrinología de la reproducción, docente Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Cll 59ª # 63-20 Bl.14 Of.317 nvasquez@unalmed.edu.co, Grupo de investigación en biotecnología animal, BioA.

<sup>2</sup> Jorge Gómez Oquendo, Médico Veterinario, docente Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid. Grupo de investigación en Biotecnología Animal, GIBA. Cr 48 # 7-151 Of. P36-118 jegomez52@gmail.com

<sup>3</sup> Juan Camilo Álvarez Balvin, Ing. Agropecuario Politécnico CJIC, MSc(c) Biotecnología, UN de Colombia sede Medellín. Miembro grupo GIBA. agrox85@gmail.com

<sup>4</sup> Natalia Andrea Chavarría, Estudiante de Ingeniería Biológica de Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Grupo BioA. nachavar@unalmed.edu.co

## RESUMEN

La eficiencia en la producción de embriones *in vitro* puede verse afectada por un déficit en la competencia para el desarrollo del oocito, completada durante su maduración *in vitro* (MIV). Con el objetivo de evaluar la influencia de la concentración de oxígeno sobre la maduración nuclear, complejos cúmulos oocito, fueron incubados en condiciones normales de maduración (5% CO<sub>2</sub> y 20% O<sub>2</sub>), y un segundo grupo en un ambiente hermético con una mezcla de gases de 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 90% N<sub>2</sub>. Después de 24 horas de incubación, se evaluó el estado de maduración nuclear, sin encontrar diferencias significativas entre los dos grupos experimentales (P<0.05). En conclusión la concentración atmosférica de oxígeno (5% y 20%) durante la MIV, no genera efectos deletéreos sobre la maduración nuclear del oocito, lo que permite proponer el uso de un sistema hermético con atmósfera controlada (5% O<sub>2</sub>) de alta eficiencia y económico.

**Palabras clave:** oocitos, maduración *in vitro*, concentración de oxígeno

Recibido: 16 de Abril de 2009. Aceptado: 19 de Junio de 2009

Received: April 16, 2009 Accepted: June 19, 2009

## COMPARISON OF TWO METHODS TO INCUBATION ON *IN VITRO* MATURATION OF BOVINE OOCYTES

### ABSTRACT

*The efficiency of in vitro embryo production can be affected by a deficit in the developmental competence of oocyte, completed during its in vitro maturation (IVM). With the aim of evaluating the influence of oxygen concentration on nuclear maturation, cumulus oocyte complexes were incubated under normal maturation conditions (5% CO<sub>2</sub> and 20% O<sub>2</sub>), and a second group under an air-tight environment composed by a gas mixture of 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>. After of 24 hours of incubation, it was evaluated the nuclear maturation stage, without to find significant differences between the two experimental groups (P <0.05). In conclusion, the atmospheric concentration of oxygen (5% and 20%) during the IVM of bovine oocytes, do not cause deleterious effects on oocyte nuclear maturation, which allow us to propose the use of an air-tight system with controlled atmosphere (5% O<sub>2</sub>) highly efficient and inexpensive.*

**Keywords:** oocytes, *in vitro* maturation, oxygen concentration.

## 1. INTRODUCCIÓN

En el ovario de una hembra bovina la dotación de gametos es finita y viene fijada desde el momento de su nacimiento. En la vida embrionaria la formación de estos gametos se inician en el día 70 a partir de las células primordiales germinales (PGC) que al colonizar la futura gónada, sufren diversas divisiones mitóticas para formar las oogonias. Estas oogonias en el día 82 de la gestación sufren meiosis incompleta (avance hasta la profase I, donde ocurre el primer bloqueo) convirtiéndose en oocito primario, que se empieza a rodear de células somáticas conocidas como células de la pregranulosa, constituyéndose así el folículo primordial (Lorenzo, P., 1992) [1]. Alrededor del día 140 estas células empiezan a sufrir cambios importantes en relación con sus funciones de conexión con el oocito, con la formación de uniones de comunicación o uniones GAP, encargadas de la transferencia de nutrientes, y la síntesis de factores de crecimiento y de glicoproteínas de la zona pelúcida (Picton, 2001) [2], formando el folículo primario. Factores propios de esta unidad folicular, causan una actividad mitótica, incrementando la capa de células de la granulosa lo cual induce a la formación de folículos secundarios. Se observa que desde la etapa fetal, la hembra inicia su actividad ovárica, pero sólo después de su nacimiento y su entrada en la pubertad, la influencia de las hormonas estimulante del folículo (FSH) y luteinizante (LH), permiten que el folículo continúe su desarrollo con el incremento de una actividad esteroideogénica, evidenciada por la acumulación de metabolitos entre ellos el estrógeno, en una cavidad del folículo llamada antrum (Monniaux et al., 1997) [3]. Aquí el folículo pasa a ser folículo preantral, de aquí en adelante el folículo continúa creciendo hasta llegar al estadio de folículo preovulatorio, que bajo un pico estimulante la hormona LH ovulará.

Como se mencionó, el oocito durante toda la etapa de formación del folículo o foliculogénesis se encuentra bloqueado meióticamente (caracterizado por un núcleo prominente conocido como vesícula germinal), sin embargo, momentos antes de la ovulación el estímulo hormonal causa la continuación de la meiosis hasta la metafase II, evidenciado por la expulsión del primer cuerpo polar (Eppig, 1996) [4], donde ocurre un segundo bloqueo. Este proceso conocido como maduración del oocito, es el responsable de generar en el oocito una serie de cambios citoplasmáticos

(síntesis de proteínas y RNA, ubicación de mitocondrias y gránulos corticales en la periferia del oocito), (Fair et al., 1997) [5] y nucleares (rompimiento de la vesícula germinal -GVBD-, reorganización cromosómica, avance de la meiosis y expulsión del primer cuerpo polar), necesarios para que se lleve a cabo la fecundación (Whitaker, 1996) [6]. El estudio de la maduración en condiciones *in Vitro*, ha determinado un tiempo promedio de 24 horas para llevarse a cabo estos cambios (Arlotto, J.L., 1996) [7].

Los oocitos madurados en condiciones *in vivo* o *in vitro*, poseen tasa similares de maduración nuclear, fertilización y clivaje (división celular post-fecundación), sin embargo difieren en la tasa de desarrollo hasta blastocisto (Sirard y Blondin, 1996) [8], mientras que en *in vivo* el 85% de los oocitos inseminados sostienen un desarrollo embrionario adecuado, en condiciones *in vitro* solo una cuarta parte llegan hasta blastocisto (Mayes, M., 2002) [9].

La maduración *in vitro* (MIV) es una importante tecnología reproductiva que busca generar oocitos maduros con la capacidad de soportar un desarrollo embrionario preimplantatorio y un completo desarrollo a término. En la actualidad existen numerosos incentivos clínicos y comerciales para el mejoramiento de esta etapa inicial en la producción de embriones *in vitro*, mediante la investigación de eventos como la competencia para el desarrollo, las interacciones entre oocito-células somáticas, comunicaciones vía uniones GAP, el comportamiento paracrino entre los dos tipos de célula, entre otros (Gilchrist et al., 2007) [10]. El estudio detallado de los requerimientos del oocito en condiciones *in vitro*, exige un conocimiento de las variables externas influyentes, para lo cual se podría abordar el estudio del medio de cultivo, las condiciones fisicoquímicas y el sistema y duración de cultivo. La evaluación en laboratorio de la maduración, se basa en la observación de las células del cúmulo (capa de células de la granulosa), las cuales en el oocito inmaduro forman una capa compacta y que al avanzar la maduración se van expandiendo hasta llegar a un nivel de expansión máxima, lo cual se interpreta como un signo de maduración. Igualmente la presencia del primer cuerpo polar evidencia la finalización de la maduración nuclear con el avance de la meiosis hasta la metafase II. Las condiciones de maduración determinantes en la eficiencia del proceso, se centran en el medio de cultivo, el cual constituye el sustrato que debe otorgar al oocito las

fuentes energéticas, proteicas, minerales, antibióticas y hormonales, necesarias para su maduración (Memili, 2007) [11]. Las condiciones fisicoquímicas, deben ofrecer al oocito los componentes necesarios para imitar el ambiente folicular y el oviducto, entre estos, la temperatura, el pH, la presión osmótica y la composición atmosférica.

El ambiente ovárico posee una concentración de oxígeno inferior a la atmosférica la cual se acerca al 20% (Fischer and Bavister, 1999) [12]. Numerosos estudios para el control de la atmósfera gaseosa durante la MIV, especialmente la concentración de oxígeno cuyos efectos deletéreos se relacionan con la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs), han demostrado que al reducir las concentraciones de oxígeno hasta el 5-10% se mejora la tasa de desarrollo (Fujitani et al., 1997) [13]. Las EROs corresponden a un grupo de especies químicas no estables, que mediante reacciones en cadena, toman o ceden electrones de moléculas esenciales para la vida celular, alterando su funcionalidad y dando origen a otros radicales químicamente más agresivos, amenazando así la estabilidad de los sistemas vivos. Numerosas patologías se han reportado como causa de este fenómeno, entre ellos daños en membranas celulares, organelas y ADN (Fujii et al., 2005) [14].

Dentro de las condiciones atmosféricas estándar usadas en los sistemas de producción de embriones *in vitro*, se ha venido empleando un 5% de CO<sub>2</sub> en aire, es decir con oxígeno atmosférico (20%), empleándose un sistema regulado y constante de reposición de gases en la incubadora que representa un costo significativo, sin la garantía de obtener los mejores resultados dado los altos niveles de oxígeno presentes en la mezcla. En otros trabajos buscando imitar las condiciones *in vivo*, se ha reportado el uso de mezclas gaseosas de 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 90% N<sub>2</sub> (Lim et al., 1999) [15], en cualquiera de los casos, se continúa empleando el sistema de alimentación por cilindros lo cual incide negativamente sobre los costos de producción.

En este trabajo se evaluó el efecto de un ambiente alternativo de mezcla gases con un bajo porcentaje de oxígeno (5 %CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% de N<sub>2</sub>) sobre la maduración nuclear de oocitos bovinos, implementando un sistema hermético de bajo

costo, adaptado para la incubación modular independiente de un insuflado continuo.

## 2. METODOLOGÍA

### OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL MATERIAL DE ESTUDIO

Los ovarios de bovino, fueron obtenidos de hembras sacrificadas en la Planta de Beneficio de la Central Ganadera del municipio de Medellín. Los ovarios se depositaron en solución de tampón fosfato salino (PBS) estéril a 37°C y luego fueron transportados (30 minutos aproximadamente) hacia el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional Sede Medellín para su procesamiento.

En el laboratorio, bajo condiciones asépticas, se lavaron los ovarios con PBS a 37°C para retirar material contaminante, sangre y detritus. Luego con aguja N°18 en jeringa de 5 mL, se procedió a la aspiración de los folículos con un diámetro de 3 a 6 mm y el líquido folicular fue recolectado en tubos cónicos de 15 mL mantenidos a 37°C.

El líquido folicular se dejó en reposo durante 15-20 minutos en incubadora de CO<sub>2</sub>. Luego se procedió a descartar el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 5mL de medio de lavado (medio TL-HEPES) y se depositó luego en caja de Petri estéril de 60 x 15 mm. Con un estereomicroscopio se seleccionaron los complejos Cúmulo Oocito (CCOs) de buena calidad caracterizados por presentar un citoplasma homogéneo que llenara el espacio delimitado por la zona pelúcida y dos a tres capas de con distribución uniforme y compactas, sin signos de expansión o atresia.

### MADURACIÓN *IN VITRO*

El medio de maduración empleado fue TCM-199 con sales de Hank's (Sigma Ref. M3274) suplementado con 2.2g/L de bicarbonato de sodio, 275 g/mL de ácido pirúvico, 29.2 g/mL de glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 100 g/mL de estreptomycin, 0.25 g/mL de anfotericina B, 1 g/mL de estradiol, 10% de suero bovino fetal y gonadotropinas (1,0 µg/mL de FSH porcina y 10,0 UI/mL de LH recombinante humana).

## SISTEMAS DE INCUBACIÓN EVALUADOS

Los grupos experimentales presentaron como variable independiente a evaluar, la condición atmosférica, 5% de O<sub>2</sub> y 20% de O<sub>2</sub>

**Grupo experimental 1:** 5% CO<sub>2</sub> en aire (más el 20% de oxígeno atmosférico), 38,5°C y 90% de humedad relativa. El CO<sub>2</sub> fue suministrado por una pipeta CO<sub>2</sub> anaeróbico y regulado por la misma incubadora.

**Grupo experimental 2:** 5% CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub>, 90% de N<sub>2</sub>, 38,5°C y humedad relativa máxima. Esta incubación se llevo a cabo en un compartimiento hermético donde se inyectó la mezcla de gases (figura 1).

En el grupo experimental 2, cada 12 horas se reemplazó la mezcla de gases, con el objetivo de mantener los niveles adecuados de la mezcla de gases sin afectar la viabilidad de los CCOs.

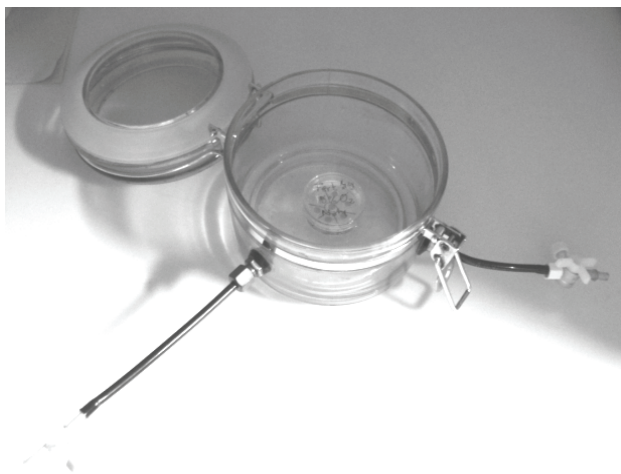


Fig. 1. Compartimento hermético modificado, evaluado para la incubación con gases controlados.

El sistema hermético, se construyó a partir de un recipiente de fácil y económica consecución comercial, comúnmente empleado para el almacenamiento de alimentos; al cual se le adaptó dos conductos con válvulas para la regulación del insuflado. En el fondo se adicionaron 5 ml de agua destilada para asegurar la máxima humedad relativa al interior del compartimento, y se ubicó una caja de Petri de vidrio como superficie para la ubicación de las cajas de cultivo con los CCOs. Posterior al cierre del recipiente, se procedió a abrir las válvulas de regulación, una de ellas para el

ingreso de la mezcla de gases y la otra para la salida del mismo gas, permitiendo un reemplazo gradual del aire interno por la mezcla evaluada, finalmente se cerró la válvula de ingreso de la mezcla seguida de la segunda válvula, esto con el objetivo de no generar una presión interna. El compartimento hermético fue mantenido en una incubadora que sólo mantenía la temperatura del sistema a 38,5°C.

## EVALUACIÓN DEL AVANCE MEIÓTICO (MADURACIÓN NUCLEAR)

Al terminar el tiempo de maduración de 24 horas, los oocitos fueron desnudados por pipeteo en hialuronidasa al 2%, eliminando del oocito las células del cúmulo circundantes, con el cuidado de no afectar la zona pelúcida. Luego, los oocitos desnudos fueron transferidos a una gota con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) a una concentración de 0,225 g/ml por 3 a 5 minutos en oscuridad. Posteriormente fueron lavados en medio de maduración con el objetivo de eliminar el exceso de DAPI y pasados a una gota de medio en un portaobjetos. La observación se realizó en un microscopio de fluorescencia con filtro de 380nm a 500nm y se evaluó la presencia o ausencia del primer cuerpo polar y se determinó el porcentaje de maduración nuclear (Figura 2).

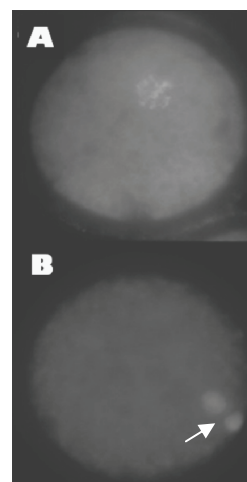


Fig. 2. Evaluación del avance meiótico o maduración nuclear en oocitos bovinos. (A) Oocito Inmaduro en vesícula germinal. (B) Oocito maduro: Metafase II, evidenciado por el primer cuerpo polar.



### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un estudio experimental de diseño de bloques al azar, en el que se determinó el efecto de dos métodos de incubación por 24 horas (5% de O<sub>2</sub> y 20% de O<sub>2</sub>) sobre la tasa de maduración nuclear del oocito de bovino. Se trabajo con un n total de 100 CCO que fueron distribuidos en 2 tratamientos y cinco repeticiones. Los datos fueron expresados como promedio ± error estándar de la media y se realizó una comparación de medias por la prueba t de Student. El programa que se utilizo fue el Statistical versión 6.0.

### 3. RESULTADOS

Un total de 100 COCs distribuidos en dos grupos experimentales, en donde el grupo 1 fue incubado bajo las condiciones de 5%CO<sub>2</sub>-20% y el grupo 2 en O<sub>2</sub>5%CO<sub>2</sub>-5%O<sub>2</sub>-90%N<sub>2</sub>. Después de 24 horas de incubación, los oocitos fueron desnudados para evaluar la presencia del primer cuerpo polar, mediante la tinción con DAPI. Se calculó el porcentaje promedio de expulsión del primer cuerpo polar en los oocitos presentes por gota de cultivo (10 COCs). Se realizaron 5 repeticiones por cada tratamiento.

El porcentaje promedio de maduración nuclear (metafase II) obtenido bajo las condiciones de incubación del grupo 1 fue de 79,18%, mientras que los del grupo 2 fue del 71,52% (Tabla 1).

Tabla 1 Parámetros estadísticos de maduración nuclear *in vitro* para las condiciones de incubación con 5%O<sub>2</sub> y 20%O<sub>2</sub>

Tratamiento Parámetro*	5%CO <sub>2</sub> -5%O <sub>2</sub> - 90%N <sub>2</sub>	5%CO <sub>2</sub> - 20%O <sub>2</sub>
Número de oocitos	50	50
Promedio	79.175	71.515
Desviación estándar	15.937	10.316
Valor mínimo	66.700	57.100
Valor máximo	100.00	80.000
Error estándar	7.698	5.158

\* Unidades en % de maduración sobre cada unidad experimental

La comparación estadística entre las medias de cada unidad experimental de los grupos de oocitos

sometidos a maduración con diferentes concentraciones de oxígeno, se realizó mediante una prueba de t, arrojando los resultados presentados en la tabla 2.

Tabla 2. Comparación de medias por la prueba t

Hipótesis	Valor de t	Valor de P*
Gr1 = Gr2	0.8007	0.4539

Gr1 & Gr2 hacen referencia a las medias de cada tratamiento:

Gr1= 5%CO<sub>2</sub>-5%O<sub>2</sub>-90%N<sub>2</sub> Gr2= 5%CO<sub>2</sub>-20%O<sub>2</sub>

\*Valores estadísticamente significativos con P<0.05

### 4. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS

Teniendo en cuenta que la maduración nuclear del oocito es uno de los pasos requeridos para la producción *in vitro* de embriones, y con el objetivo de implementar un sistema de cultivo hermético económico, en el presente trabajo, se evaluó el efecto de la concentración de oxígeno sobre la maduración *in vitro*, en donde se obtuvo un porcentaje de maduración nuclear del 79.18% cuando se incubo a condiciones de oxígeno de 5%, no encontrando diferencia significativa (P >0.05) con los datos de la incubación con oxígeno atmosférico del 20% (71.52%). Esto sugiere que el ambiente hermético puede reemplazar las condiciones estándar de cultivo en los procedimientos de maduración *in vitro*, sin generar efectos deletéreos.

Los porcentajes de maduración nuclear (metafase II) encontrados en este trabajo son similares a los reportados por De Wit, et al., 2000 [16] (70-75%), quienes utilizaron complejos de características óptimas (cúmulo compacto, uniformidad citoplasmática) e incubaron por 24 horas en condiciones estándar (20% de oxígeno). En otras especies como porcinos, en los que se ha evaluado los dos ambientes de incubación (5% y 20% de oxígeno), no se encuentran diferencias significativas al comparar las tasas de maduración (77.9% y 74.4%, respectivamente) y fertilización *in vitro* (50.1% y 54.2%, respectivamente) (Kurniani, et al., 2004) [17].

El manejo de los niveles de oxígeno en el ambiente de incubación durante la maduración *in vitro*, juega un papel muy importante en el desarrollo, debido a

que se ha encontrado que oocitos madurados al 2% de oxígeno, aumentan la tasa de apoptosis en el estado de blastocisto comparado con un 5% de oxígeno (Banwell et al., 2007) [18]. Además el efecto de la concentración del oxígeno ha sido evaluado durante el desarrollo embrionario *in vitro* en caprinos y bovinos, reportando que en las concentraciones que oscilaban entre el 4% y el 8% de oxígeno se encontraron los mejores porcentajes de clivaje (23-29%) (Thompson et al., 1990) [19].

Uno de los factores importantes en el estudio de los niveles de oxígeno en los sistemas de incubación *in vitro*, se centra en la búsqueda de estrategias que permitan disminuir la incidencia de las especies reactivas de oxígenos (EROs), que son generadas en procesos normales de metabolismo celular y han sido implicadas en diversos daños celulares; sin embargo en el oocito y células del cúmulo se ha detectado la expresión de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa y catalasa, sugiriendo que el oocito tiene la capacidad de controlar el aumento de EROs (Cetica, P.D. et al., 2001) [20]; a pesar de esto, el cultivo en condiciones de 20% de oxígeno requiere suplementos antioxidantes en el medio de cultivo, tales como,  $\beta$ -mercaptoetanol, vitamina E y vitamina C (Dalvit et al., 2005) [21].

Finalmente, a partir del uso de un sistema hermético con atmósfera controlada (5% de oxígeno), se pueden obtener resultados de maduración *in vitro* de oocitos bovinos, similares al sistema convencional de incubación, con la diferencia de que este último requiere de una demanda constante de circulación de gases, mientras que el sistema hermético permite la inyección de la mezcla gaseosa deseada. Estas diferencias repercuten notablemente sobre los costos del proceso *in vitro*, ya que el modelo propuesto en esta investigación demanda cantidades mínimas de gases y permitiría emplear una incubadora que solo regule la temperatura.

## 5. CONCLUSIÓN

La concentración atmosférica de oxígeno (5% y 20%) en el medio de incubación no genera efectos deletéreos sobre la competencia meiótica del oocito, evidenciada por los porcentajes de maduración nuclear (metafase II).

El sistema hermético empleado para la disminución de las concentraciones de oxígeno atmosférico, permite obtener porcentajes de maduración similares a los obtenidos en sistemas de incubación estándar, permitiendo implementar un sistema de incubación económico y eficiente.

## 6. PERSPECTIVAS

Se propone en futuros trabajos, avanzar en el estudio de las condiciones de incubación propuestas sobre los eventos de la fertilización y desarrollo embrionario, evaluando las tasas de fertilización, clivaje y obtención de blastocistos. Asimismo, se hace necesario avanzar en la evaluación de la calidad embrionaria obtenida bajo los sistemas de incubación evaluados.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Lorenzo González, Pedro. Maduración *in vitro* de oocitos de Ganado vacuno. [Tesis doctoral]. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de veterinaria. Departamento de fisiología animal. Madrid, 1992.
- [2] Picton, H.M. Activation of follicle development: the primordial follicle, *Theriogenology*, 55, 193-210, 2001.
- [3] Monniaux D, Monget P, Besnard N, Huet C, Pisselet C. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants, *Theriogenology*, 47, 3-12, 1997.
- [4] Eppig, J.J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals, *Reproduction Fertility and Development*. 8-4, 485-489, 1996.
- [5] Fair. T., Hulshof S.C., Hyttel P., Greve T. and Boland M. Oocyte ultra structure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anatomy and Embryology*, 195, 327-336, 1997.
- [6] Whitaker, M. Control of Meiotic Arrest, *Review of Reproduction*, 1, 127-135, 1996.
- [7] Arlotto, J.L. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* Maturation and development of bovine oocytes, *Theriogenology*, 45, 943-956, 1996.

[8] Sirard, M.A. and Blondin, P. Oocyte maturation and IVF in cattle, *Animal Reproduction Science*, 42, 417-426, 1996.

[9] Mayes, Mario. The meiotic arrest of bovine oocytes. [Tesis post-doctoral]. Universidad Laval. Facultad de ciencias de la agricultura y la alimentación. Departamento de ciencias animales. Quebec, 2002.

[10] Gilchrist, R. Thompson J. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro, *Theryogenology*, 67, 6-15, 2007.

[11] Memili, E., Sagirkaya, H., Misirlioglu, M., Kaya, A., First, N., Parrish, J. et al. Developmental potential of bovine oocytes cultures in different maturation and culture conditions, *Animal Reproduction Science*, 101, 225-240, 2007.

[12] Fischer, B. and Bavister, B.D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits, *J. Reprod. Fert.*, 99, 673-679, 1999.

[13] Fujitani, Y., Kasai, K., Ohtani, S., Nishimura, K., Yamada, M., and Utsumi, K. Effect of oxygen concentration and free radicals on in vitro development of in vitro produced bovine embryos, *Journal of animal science*, 75, 483-489, 1997.

[14] Fujii, J. Iuchi, Y., Futoshi O. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanism in the female reproductive system, *Reproductive biology and endocrinology*, 3, 43-52, 2005.

[15] Lim, J.M., Reggio, B.C., Godke R.A. and Hansel W.. Development of in vitro-derived bovine embryos cultured in 5% CO<sub>2</sub> in air or in 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>, *Human Reproduction*, 14, 458-464, 1999.

[16] De Wit A.A., Wurth A., and Kruij, T.A. 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, 2000.

[17] Kurniani, N., Wongsrikeao, P., Murakami, M., Agung, B., Fahrudin, M., Nagai, T., Otoi, T. Effects of oxygen tension on the development and quality

of porcine in vitro fertilized embryos, *Theriogenology*, 62, 1585-1595, 2004.

[18] Banwell, K.M., Lane, M., Russell, D.L., Kind K.L. and Thompson J.G. Oxygen concentration during mouse in vitro maturation affects embryo and fetal development, *Human reproduction*, 22 No.10, 2768-2775, 2007.

[19] Thompson, J.G., Simpson A.C., Pugh P.A., Donnelly P.E., and Tervit H.R. Effect of oxygen concentration on in vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos, *Journal of reproduction and fertility*, 89, 573-578, 1990.

[20] Cetica, P.D., Pintos L.N., Dalvit G.C., Beconi M.T. Antioxidant Enzyme Activity and Oxidative Stress in Bovine Oocyte In Vitro Maturation, *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1, 57-64, 2001.

[21] Dalvit, G., Llanes, S. P., Descalzo, A., Insani, M., Beconi, M., Cetica, P. et al., Effect of alpha tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte in vitro maturation, *Reprod. Dom. Anim.*, 40, 93-97, 2005.