

Un sistema de co-cultivo con células del *cumulus oophorus* mejora la calidad de embriones bovinos producidos *in vitro*

A co-culture system with *cumulus oophorus* cells improves the quality of bovine embryos produced *in vitro*

Susana Guevara-Chacón¹, Hurley Abel Quispe-Ccasa^{2,3}, José Américo Saucedo-Uriarte², Ilse Silvia Cayo-Colca^{1,2}

RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo determinar la influencia de un sistema de co-cultivo con células del *cumulus oophorus* sobre la calidad de embriones bovinos producidos *in vitro* en función a su viabilidad. Se utilizaron ovarios de bovinos hembra cruzadas, sacrificadas en el Centro de Beneficio Municipal de Chachapoyas, Amazonas, Perú. Los ovocitos aspirados de folículos de 2-6 mm fueron madurados en medio TCM-199 por 24 horas, en una atmósfera humidificada con 6% de CO₂ y a 38.5 °C. El estado de maduración fue determinado mediante el estadio nuclear a través de tinción acetoorceína. Los ovocitos maduros se fertilizaron *in vitro* con semen congelado de toros Angus durante 18 horas. Los presuntos cigotos fueron distribuidos aleatoriamente para su desarrollo en un grupo en medio con co-cultivo y otro en medio sin co-cultivo (control). Se determinó la calidad embrionaria en función a la actividad enzimática y daño al ADN de los embriones al séptimo día del cultivo, mediante los fluorocromos diacetato de fluoresceína (FDA) y yoduro de propidio (PI), respectivamente. No se encontró asociación significativa en la cantidad de embriones producidos *in vitro*, pero hubo diferencia significativa en viabilidad embrionaria a favor del sistema con co-cultivo ($p < 0.05$). El uso de co-cultivos con células de *cumulus oophorus* mejora la viabilidad y, por lo tanto, la calidad embrionaria, sin influir en la tasa de producción de embriones *in vitro*.

Palabras clave: *cumulus oophorus*, fecundación *in vitro*, cultivo *in vitro*, viabilidad embrionaria, actividad enzimática

¹ Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Perú

² Escuela de Posgrado, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Perú

³ E-mail: hurleyabelqc@gmail.com

Recibido: 6 de noviembre de 2019

Aceptado para publicación: 23 de junio de 2020

Publicado: 11 de agosto de 2020

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the influence of a co-culture system with *cumulus oophorus* cells on the quality of bovine embryos produced *in vitro*, based on their viability. Ovaries from crossbred bovine slaughtered at the Chachapoyas Municipal Benefit Centre, Amazonas, Peru, were used. Oocytes aspirated from 2-6 mm follicles were matured in TCM-199 medium for 24 hours, in a humidified atmosphere with 6% CO₂ and 38.5 °C. The maturation state was determined by the nuclear stage through aceto-orcein staining. The mature oocytes were fertilized *in vitro* with frozen semen from Angus bulls for 18 hours. The presumed zygotes were randomly distributed for development in one group in medium with co-culture and another in medium without co-culture (control). The embryonic quality was determined based on the enzymatic activity and DNA damage of the embryos on the seventh day of culture, using the fluorochromes fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI), respectively. No significant association was found in the number of embryos produced *in vitro*, but there was a significant difference in embryonic viability in favour of the system with co-culture ($p < 0.05$). The use of co-cultures with *cumulus oophorus* cells improves viability and, therefore, embryonic quality, without influencing the rate of embryo production *in vitro*.

Key words: *cumulus oophorus*, *in vitro* fertilization, *in vitro* culture, embryonic viability, enzymatic activity

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevas biotecnologías para la obtención de líneas animales genéticamente superiores se basa en las técnicas de fecundación *in vitro* y cultivo de embriones. La producción de embriones *in vitro* es una herramienta valiosa para el desarrollo de la biotecnología, y los sistemas de co-cultivo son un complemento de esta tecnología, que se fundamenta en los procesos fisiológicos del desarrollo embrionario temprano que acontecen en los animales *in vivo* (Peláez, 2011).

La producción de embriones *in vitro* comprende tres pasos: la maduración de ovocitos *in vitro* obtenidos de la aspiración de folículos ováricos, la fecundación *in vitro* con gametos masculinos y, finalmente, el cultivo *in vitro* de embriones (Urrego *et al.*, 2008). Cada uno de estos pasos involucran una serie de procesos fisiológicos relacionados entre sí, donde juega un papel importante la interacción que existe entre el óvulo y las

células del *cumulus oophorus* (CCs) (Ferré y Cattaneo, 2013), para lograr la mayor tasa de ovocitos fertilizados y embriones viables. Los parámetros que miden la eficacia de la producción de embriones *in vitro* son la cantidad y calidad de los blastocistos que se logran (Ahuja *et al.*, 2009).

La tasa de producción de embriones *in vitro* no ha variado en muchos años y la calidad de estos embriones continúa siendo inferior a la de los producidos *in vivo*, por diferencias morfológicas, funcionales y metabólicas, por alteraciones en expresión génica y por una mayor incidencia de apoptosis o muerte celular (Hirayama *et al.*, 2014; Valleh *et al.*, 2014). Para mejorar la calidad de los embriones se debe imitar las condiciones de un sistema *in vivo*, utilizando células que provengan de órganos donde naturalmente suceden estos eventos *in vivo* (Rexroad y Powell, 1988). El *cumulus oophorus* es un grupo de células que rodean al ovocito dentro del folículo ovárico y después de la ovulación, y son responsables de

desarrollo de competencia y maduración (Marei *et al.*, 2012). Un sistema de co-cultivo con células del *cumulus* es capaz de mejorar el medio de cultivo *in vitro*, permitiendo lograr estadios embrionarios avanzados como mórulas y blastocistos (Lorenzini, 1997).

Por ello, con el fin de mejorar los parámetros actuales de cantidad y calidad de embriones, el estudio tuvo como propósito determinar la influencia de un sistema de co-cultivo con células del *cumulus oophurus* sobre la tasa y viabilidad de embriones bovinos producidos *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los medios y reactivos utilizados fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), a menos que se especifique lo contrario.

Ubicación del Estudio

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Animal, Reproducción y Mejoramiento Genético de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Perú. Los ovarios fueron colectados de hembras bovinas cruzadas (*Bos taurus*) sacrificadas en el Centro de Beneficio Municipal de Chachapoyas, región Amazonas, Perú, a una altitud de 2341 msnm.

Aspiración y Selección de Células del Cumulus (CC)

Los ovarios con presencia de cuerpo lúteo, cuerpo hemorrágico y presencia de folículo dominante fueron transportados al laboratorio en un recipiente isotérmico con solución salina de cloruro de sodio al 0.9% y 0.0625 mg/ml de estreptomina, temperado a 38 °C. Luego de un lavado en solución NaCl 0.9%, se aspiraron los folículos de 2-6 mm de diámetro (Raghu *et al.*, 2002), con una aguja 18G 1½» y jeringa de 10 ml cargada con medio PBS-PVA (8 g de KCl, 0.2 g de

NaCl, 2.9 g de Na₂HPO₄, 0.2 g de KH₂PO₄, 1 g de PVA en 1 L de agua) suplementado con 0.01 mg/ml de gentamicina. La búsqueda y selección de los COCs se realizó en estereoscopio (Olympus, Japón) con el mismo medio de aspiración y temperado a 37 °C. Se seleccionaron COCs con ovocitos de más de cuatro capas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo (Categoría A), y con una a tres capas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo (categoría B) (Senatore *et al.*, 2010).

Aislamiento y Cultivo de COCs

Las células del *cumulus oophurus* (CC) se obtuvieron al momento de la aspiración folicular, ya que estas se desprenden de los COC. Estas células fueron aisladas y cultivadas en una placa de 60 mm, dentro de gotas de 100 µl del medio de cultivo que contenían medio SOF base modificado (0.6294 g de NaCl, 0.0534 g de KCl, 0.0162 g de KH₂PO₄, 0.2106 g de NaHCO₃, 0.018 g de CaCl₂·2H₂O, 0.00996 g de MgCl₂·6H₂O, 3.3 g de Na-piruvato, 47 µl de Na-Lactato, 0.0146 g de L-glutamina, 0.0080 g de kanamicina, 0.0002 g de rojo fenol, 0.3 g de BSA y 100 ml de agua), suplementado con 1X de aminoácidos esenciales, 1X de aminoácidos no esenciales y 0.04 mg/ml de mioinositol. Las gotas se cubrieron de aceite mineral y se incubaron en atmosfera humidificada a 38.5 °C y con 6% de CO₂ durante 42 horas (Kubo *et al.*, 2015).

Maduración *in vitro*

Se obtuvieron 800 COCs, que fueron sometidos a maduración en medio TCM-199 suplementado con 0.5 mg/ml de piruvato de sodio, 12 µg/ml de EGF (Factor de Crecimiento Epidermal), 0.05 UI/ml de FSH (Hormona Folículo Estimulante), 0.05 UI/ml de LH (Hormona Luteinizante), 0.004 UI/ml de HMG (Gonadotropina Menopáusica Humana) y 10% de SFB (Suero Fetal Bovino), en placas de 35 mm (Nunc, USA) dentro de una incubadora (ESCO, Singapur) con 6% de CO₂ a

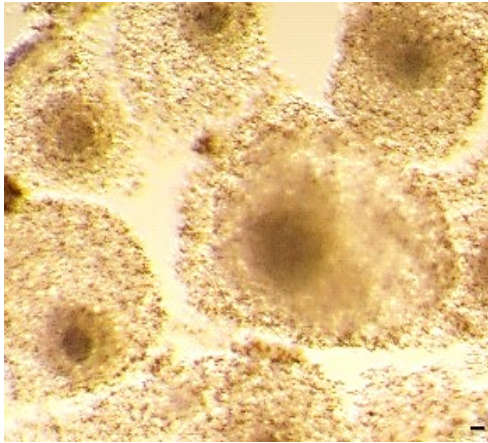


Figura 1. Expansión de células del *cumulus oophorus* de los complejos ovocito-cumulus (COCs) luego de 24 horas de maduración *in vitro*. La barra indica 50 μm

38.5 °C, durante 24 horas (Figura 1). Luego de la incubación, los ovocitos fueron clasificados como maduros o en metafase II, por la presencia del corpúsculo polar, cromosomas condensados y ausencia de vesícula germinal. Para ello, 10% de ovocitos maduros seleccionados al azar y desnudados, fueron fijados en placas portaobjetos y sumergidos parcialmente en solución de ácido acético-etanol (1:3, vol/vol). Luego de 72 horas como mínimo, fueron teñidos con 1% de solución acetoorceína (wt/vol) (Motlik y Fulka, 1976) y se evaluó la estructura nuclear en un microscopio binocular (Olympus, Japón) con objetivo de 40X.

Fecundación y Cultivo *in vitro*

Se utilizó semen congelado en pajillas de toros Angus con fertilidad comprobada. Se seleccionaron los espermatozoides de mayor motilidad mediante gradiente de Percoll (Parrish *et al.*, 1995) en una centrifuga (BOECO, Alemania), y capacitados en medio SOF base modificado previamente descrito, suplementado con 0.24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de heparina. Los COCs madurados y los

espermatozoides capacitados se incubaron en gotas de 75 μl del medio SOF base modificado dentro de placas de 35 mm, en una atmósfera humidificada a 38.5 °C con 6% CO_2 , durante 18 horas.

Los presuntos cigotos fueron desnudados y lavados en el medio SOF base modificado suplementado con 1X de aminoácidos esenciales, 1X de aminoácidos no esenciales y 0.04 mg/ml de mioinositol. Luego, 310 cigotos confirmados con dos células como mínimo, fueron distribuidos a los dos grupos de cultivo *in vitro*. Los cigotos del grupo de cultivo con sistema de co-cultivo fueron cultivados en grupos de 25, dentro de gotas de 100 μl de medio, cubiertas con aceite mineral y en placas de 60 mm. Los cigotos del grupo control se cultivaron en grupos de 25, dentro de gotas de 75 μl de medio, cubiertas de aceite mineral y en placas de 35 mm. Ambos grupos fueron sometidos a atmósfera humidificada a 38.5 °C con 6% de CO_2 .

Viabilidad Embrionaria

Se estimó la calidad embrionaria a través de la tinción con yoduro de propidio (PI) y diacetato de fluoresceína (FDA), ya que esta combinación de fluorocromos indica el daño al ADN y la actividad enzimática, respectivamente. Para ello, los embriones en estadio de mórula y blastocisto fueron desnudados manualmente con micropipeta de 200 μl , en medio de manipulación PBS-PVA suplementado con 0.025 mg/ml de estreptomina. Luego, se colocaron en medio de tinción compuesto por PBS-PVA suplementado con 0.1 mg/ml de PI y 0.0015 mg/ml de FDA e incubados por 10 minutos. Finalmente, los embriones fueron evaluados en microscopio invertido con fluorescencia (Olympus, Japón), donde la coloración verde brillante indicó actividad enzimática y viabilidad, verde oscuro indicó daño celular y baja actividad enzimática, y coloración roja muerte celular y daño en el ADN (Figura 2). La intensidad de la coloración fue medida con el programa Adobe Photoshop CC 2014.

Cuadro 1. Estadio nuclear de complejos ovocito-*cumulus* (COCs) a las 24 horas de maduración *in vitro*

Ovocitos n (%)	Estadio nuclear	
	MII ¹ n (%)	Degenerados n (%)
80 (100)	60 (75)	20 (25)

¹ MII: ovocito maduro en metafase II

Análisis Estadístico

Se determinó la asociación del sistema de co-cultivo con la producción de cigotos y la viabilidad embrionaria mediante la prueba de Chi-cuadrado, con un nivel de confianza del 95%, en el programa Statistix 8.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Previa a la maduración *in vitro*, 30 ovocitos de las categorías A y B fueron teñidos con aceto-orceína, observándose que 86.7% de ovocitos se encontraban en estadio nuclear de vesícula germinal. Este porcentaje indica que la clasificación y selección se realizó adecuadamente para un proceso de maduración; sin embargo, 13.3% correspondió a ovocitos degenerados a pesar de que los COC fueron categorizados como A y B. Senatore *et al.* (2010) determinaron que COCs de categorías A y B poseen mayor capacidad de maduración y fecundación, pudiendo llegar a producir blastocistos, mientras que COC de categoría C y D no tienen la capacidad de maduración.

El 75% de los COCs alcanzó la metafase de la segunda división meiótica (metafase II) luego de 24 horas de incubación, mientras que el restante 25% de ovocitos degeneraron sin

llegar a madurar (Cuadro 1). Sin embargo, cabe resaltar que según la evaluación de vesícula germinal previa a la maduración *in vitro*, un porcentaje de COC categorizados como A y B ya estarían degenerados, incluso antes de ingresar al proceso de maduración. Además, todos los ovocitos presentaron expansión de células de *cumulus* al final de la maduración *in vitro*, pero solo los que culminaron el periodo de maduración presentaron la extrusión del primer corpúsculo polar. Esta tasa de maduración *in vitro* es superior al 61.4% reportado por Francisco *et al.* (2008) e inferior al 90% reportado por Soto-Martínez *et al.* (2019). Estas diferencias podrían atribuirse al tamaño de los folículos ováricos aspirados, al protocolo de maduración y a las características de los animales empleados en cada estudio. Van den Hurk y Zhao (2005) señalan que las células del *cumulus* son fundamentales para el desarrollo embrionario, ya que conectadas al citoplasma del ovocito mediante uniones gap durante la maduración, transportan nutrientes, precursores metabólicos y hormonas esenciales para la maduración del ovocito.

Después de la fertilización *in vitro*, los 310 cigotos que fueron seleccionados exhibían extrusión de pronúcleos masculino y femenino, así como la primera división (dos células). Mucci *et al.* (2006) sostienen que solo el 80% de ovocitos podrá ser fecundado y continuar dividiéndose a 2 y 4 células. Luego de siete días de cultivo, la prueba de viabilidad con FDA evidenció diferencias significativas ($p < 0.05$) y mayor actividad enzimática en embriones sometidos a un sistema con co-cultivo (51 ± 58), respecto a embriones sin co-cultivo (27 ± 26). Además, la tinción con PI evidenció menor daño a nivel del ADN en embriones del sistema con co-cultivo (Figura 2). Esta adición podría estar sincronizando la división nuclear y citoplasmática, así como previniendo el endurecimiento de la zona pelúcida para facilitar la eclosión del blastocisto (Dey *et al.*, 2012).

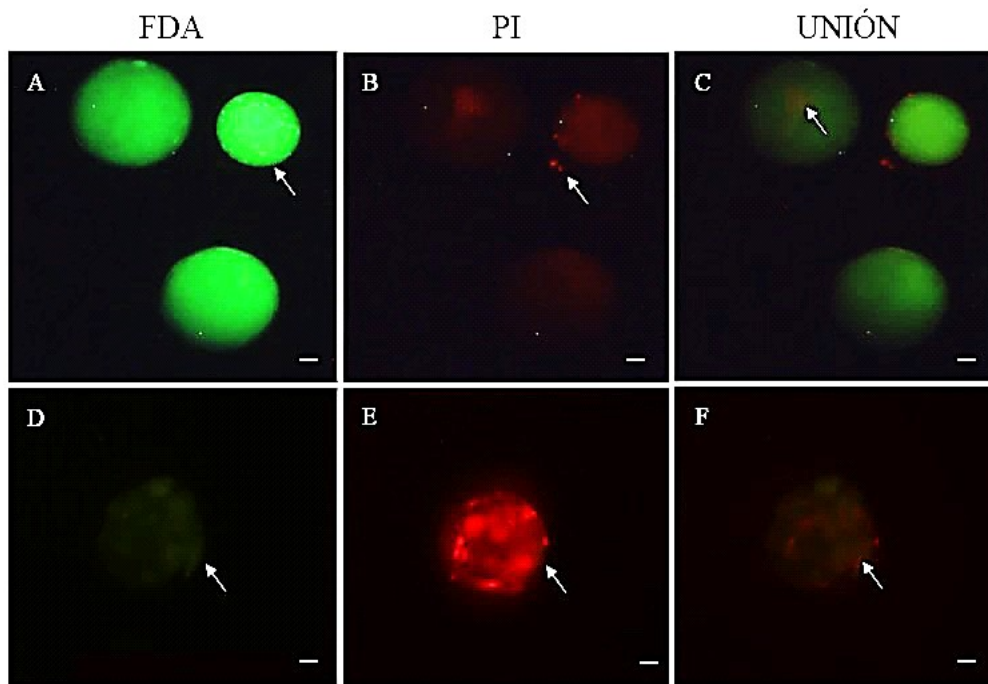


Figura 2. Viabilidad de embriones bovinos a los siete días de cultivo, mediante fluorescencia y tinción con yoduro de propidio (PI) y diacetato de fluoresceína (FDA). A: blastocisto viable (color verde brillante indica actividad enzimática-viabilidad), B: blastocisto con trazas de muerte celular (probablemente de células del *cumulus*), D: blastocisto no viable (color verde oscuro indica bajo nivel de actividad enzimática), E: blastocisto con muerte celular (color rojo brillante indica daño al ADN). La barra indica 50 μm

No se encontró diferencia significativa en el porcentaje de embriones viables entre ambos sistemas de cultivo *in vitro*, aunque aparentemente el sistema sin co-cultivo podría tener un proceso de desarrollo más acelerado que el sistema con co-cultivo. En el Cuadro 2 se aprecia el estadio embrionario alcanzado al séptimo día de cultivo *in vitro*, donde las tasas de mórula, blastocisto inicial, blastocisto propiamente dicho y blastocisto expandido, así como el porcentaje de degenerados, son similares entre ambos sistemas de cultivo y no existe asociación entre el sistema de co-cultivo y la cantidad de estructuras encontradas ($p > 0.05$). Estos hallazgos discrepan del estudio de Cordova *et al.* (2014), quienes sostienen que el co-cultivo con células epiteliales mejora la tasa de de-

sarrollo embrionario bovino, pero coincide en que se mejora su calidad.

Resultados inferiores han sido reportados por Goovaerts *et al.* (2009), con 6.3% de blastocistos en un sistema de co-cultivo con células del *cumulus* y un ambiente con mezcla de gases. No obstante, se debe considerar que en este estudio solo se usó CO_2 , de modo que el sistema de cultivo en gotas, así como los medios y periodo de cultivo pudieron influir en el proceso. Sin embargo, aunque en este estudio se observó que el sistema de co-cultivo se observó que el sistema de co-cultivo con células del *cumulus* podría estar retardando el desarrollo embrionario, pero a su vez podría influir en la sincronización de los eventos durante el ciclo celular, mejorando la calidad de los embriones pro-

Cuadro 2. Estadios de desarrollo *in vitro* de embriones bovinos hasta los siete días, según sistema de co-cultivo

Sistema de cultivo <i>in vitro</i>	n	Degenerado n (%)	Mórula n (%)	Blastocisto inicial n (%)	Blastocisto n (%)	Blastocisto expandido n (%)
sin co-cultivo	155	77 (48.9) ^a	31 (20.4) ^a	34 (22.0) ^a	11 (7.3) ^a	2 (1.4) ^a
con co-cultivo	155	73 (46.6) ^a	39 (25.7) ^a	32 (20.6) ^a	8 (5.0) ^a	3 (2.1) ^a

^a Letras iguales dentro de columnas indican diferencias no significativas ($p > 0.05$)

El co-cultivo se realizó con células del *cumulus oophorus*

ducidos (Senatore *et al.*, 2010). Las células del *cumulus* cumplen funciones importantes para el soporte nutricional de los ovocitos, secretan hormonas esteroideas e inducen la reacción acrosomal de los espermatozoides (Canipari, 1994; Mattioli *et al.*, 1998).

La producción de embriones *in vitro* genera bajas tasas de blastocistos (5-30%), consecuencia del bloqueo del desarrollo por la manipulación del óvulo o del embrión. Para evitar ello, se han empleado co-cultivos con células somáticas, células de *cumulus*, células del epitelio oviductal, obteniendo resultados controversiales (Reed *et al.*, 1996; Bousquet *et al.*, 1999; Soto-Martínez *et al.*, 2019). Staigmiller y Moor (1984) y Kamishita *et al.* (1999) observaron que en co-cultivos con células del *cumulus* y células epiteliales, respectivamente, se incrementó la capacidad de desarrollo del embrión. Las células del *cumulus* parecen tener propiedades embriotróficas, las cuales en el medio de cultivo pueden ser responsables del efecto benéfico del co-cultivo para los embriones (Mulheron y Schomberg, 1992; Vansteenbrugge *et al.*, 1994). Sin embargo, en este estudio, el uso de co-cultivo no difirió del grupo control (sin co-cultivo) respecto a la tasa de embriones producidos *in vitro*, probablemente por el protocolo empleado o fuente de células somáticas.

CONCLUSIONES

- Si bien la calidad de los ovocitos está determinada por el número de células de *cumulus* que componen el complejo ovocito-*cumulus* (COC), la morfología y el color, esta no es determinante para la competencia al momento de la maduración, ya que una proporción de COCs de categorías A y B podría encontrarse en proceso de degeneración.
- Las tasas de mórulas y blastocistos bovinos producidos *in vitro* fueron estadísticamente similares entre los sistemas de cultivo con y sin co-cultivo. Sin embargo, el uso de co-cultivos con células de *cumulus oophorus* permitió mejorar su viabilidad, evidenciada por mayor actividad enzimática y por lo tanto, una mejor calidad para continuar su desarrollo.

LITERATURA CITADA

1. Ahuja C, Montiel F, Pérez P, Gallegos J. 2009. Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Zootec Trop* 27: 277-284.

2. **Bousquet D, Twagiramungu H, Morin N, Brisson C, Carboneau G, Durocher J. 1999.** *In vitro* embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology* 51: 59-70. doi: 10.1016/s0093-691x(98)00231-3
3. **Canipari R. 1994.** Cell-cell interactions and oocyte growth. *Zygote* 2: 343-345. doi: 10.1017/S0967199400002173
4. **Cordova A, Perreau C, Uzbekova S, Ponsart C, Locatelli Y, Mermillo 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. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.01.012
5. **Dey S, Deb G, Ha A, Lee J, Bang J, Lee K, Kong I. 2012.** Coculturing denuded oocytes during the *in vitro* maturation of bovine cumulus oocytes complexes exerts a synergistic effect on embryo development. *Theriogenology* 77: 1064-1077. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.10.009
6. **Ferré L, Cattaneo L. 2013.** Biotecnologías reproductivas: producción *in vitro* de embriones y semen sexado. *Rev Med Vet (B Aires)* 94: 28-36.
7. **Francisco JBC, Ludwing H, Patricia CVM. 2008.** Estudio estructural del huso meiótico de ovocitos bovinos vitrificados. *Rev Cient (Maracaibo)* 18: 253-261.
8. **Goovaerts J, Leroy J, Van Soom A, De Cleorcq J, Andries S, Bols P. 2009.** Effect of cumulus cell cocultured on oxygen tension on the *in vitro* developmental competence of bovine zygotes cultured singly. *Theriogenology* 71: 729-738. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.038
9. **Hirayama H, Moriyasu S, Kageyama S, Sawai K, Takahashi H, Geshi M, Fujii T, et al. 2014.** Enhancement of maternal recognition of pregnancy with parthenogenetic embryos in bovine embryo transfer. *Theriogenology* 81: 1108-1115. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.01.039
10. **Kamishita H, Takagi M, Choi YH, Wijayagunawardane MPB, Miyazawa K, Sato K. 1999.** Development of *in vitro* matured and fertilized bovine embryos cocultured with bovine oviductal epithelial cells obtained from oviducts ipsilateral to cystic follicles. *Anim Reprod Sci* 56: 201-209. doi: 10.1016/s0378-4320(99)00046-9
11. **Kubo N, Cayo-Colca IS, Mijano T. 2015.** Effect of estradiol-17 β during *in vitro* growth culture on the growth, maturation, cumulus expansion and development of porcine oocytes from early antral follicles. *Anim Sci J* 86: 251-259. doi: 10.1111/asj.12283
12. **Lorenzini EJ. 1997.** Desarrollo de embriones bovinos obtenidos de ovocitos madurados *in vitro* bajo diferentes condiciones de cultivo. Tesis de Médico Veterinario. Valdivia, Chile: Univ. Austral de Chile. 52 p.
13. **Marei W, Ghafaric F, Fouladi-Nashta A. 2012.** Role of hyaluronic acid in maturation and further early embryo development of bovine oocytes. *Theriogenology* 78: 670-677. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.03.013
14. **Mattioli M, Lucidi P, Barboni B. 1998.** Expanded cumuli induce acrosome reaction in boar sperm. *Mol Reprod Dev* 51: 445-453. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199812)51:4<445::AID-MRD12>3.0.CO;2-L
15. **Motlik J, Fulka J. 1976.** Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J Exp Zool* 198: 155-162. doi: 10.1002/jez.1401980205
16. **Mucci N, Aller J, Kaiser G, Hozbor F, Alberio R. 2006.** Producción *in vitro* de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Arch Med Vet* 38: 97-104. doi: 10.4067/S0301-732X2006000200002

17. **Mulheron GW, Schomberg DW. 1992.** Effects of diethylstilbestrol on rat granulosa cell and theca/interstitial cell transforming growth factor-beta2 mRNA expression *in vivo*: analysis by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Biol Reprod* 46: 546-550. doi: 10.1095/biolreprod46.4.546
18. **Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. 1995.** Effect of bovine sperm separation by swim up or percoll on success of *in vitro* fertilization and embryo development. *Theriogenology* 44: 859-870. doi: 10.1016/0093-691X(95)-00271-9
19. **Peláez V. 2011.** Producción *in vitro* de embriones bovinos. Tesis de Médico Veterinario. Cuenca, Ecuador: Univ. de Cuenca. 86 p.
20. **Raghu HM, Nandi S, Reddy S. 2002.** Follicle size and oocyte diameter in relation to developmental competence of buffalo oocytes *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 14: 55-61. doi: 10.1071/rd01060
21. **Reed WA, Suh TK, Bunch TD, White KL. 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. doi: 10.1016/0093-691x(95)00380-q
22. **Rexroad CE, Powell AM. 1988.** Co-culture of ovine eggs with oviductal cells and trophoblastics vesicles. *Theriogenology* 29: 387-397. doi: 10.1016/0093-691X(88)90242-7
23. **Senatore E, Xu J, Suárez M, Gong G, Lin T, Bella A, Moreno J, Mannino M, et al. 2010.** Improved *in vitro* development of OPU-derived bovine (*Bos taurus*) embryos by group culture with agarose-embedded helper embryos. *Theriogenology* 74: 1643-1651. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.06.037
24. **Soto-Martínez YG, Casas-Hernández E, Betancourt-Rule JM, Fernández-Reyes F. 2019.** Desarrollo embrionario bovino *in vitro* co-cultivado con células oviductales y del *cumulus oophorus*. *Rev Salud Anim* 41(1). [Internet]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v41n1/2224-4700-rsa-41-01-e01.pdf>
25. **Staigmiller RB, Moor RM. 1984.** Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Res* 9: 221-229. doi: 10.1002/mrd.1120090211
26. **Urrego R, Tarazona A, Olivera M, Camargo O. 2008.** Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Rev Colomb Cienc Pec* 21: 398-405.
27. **Valleh MV, Hyttel P, Aabech M, Strobeck L. 2014.** Insulin-like growth factor 2: a modulator of anti-apoptosis related genes (HSP70, BCL2-L1) in bovine preimplantation embryos. *Theriogenology* 82: 942-950. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.07.003
28. **Van den Hurk R, Zhao J. 2005.** Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63: 1717-1751. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.08.005
29. **Vansteenbrugge A, Van Langendonck A, Scutenaire C, Massip A, Dessy F. 1994.** *In vitro* development of bovine embryos in buffalo rat liver-or bovine oviduct conditioned medium. *Theriogenology* 42: 931-940. doi: 10.1016/0093-691x(94)90116-z