

EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON SUERO FETAL BOVINO PARA LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OOCITOS BOVINOS SOBRE SU ACTIVIDAD MITOCONDRIAL Y DESARROLLO EMBRIONARIO

EFFECT OF BOVINE CALF SERUM SUPPLEMENTATION FOR THE *IN VITRO* MATURATION OF BOVINE OOCYTES ON THEIR MITOCHONDRIAL ACTIVITY AND EMBRYO DEVELOPMENT

Giovanni Restrepo Betancur^{1,2}; Natalia Chavarría Gutiérrez¹; Neil A. Vásquez Araque

(Recibido el 16 de febrero de 2007 y aceptado el 01 de octubre de 2007)

Resumen

Para evaluar el efecto de la suplementación de la maduración *in vitro* de oocitos bovinos con suero fetal bovino (SFB) sobre su actividad mitocondrial y desarrollo *in vitro*, se recolectaron oocitos bovinos a partir de ovarios de vacas sacrificadas en una planta de faenado, para su posterior maduración *in vitro* en medio SOFaa en tratamientos en presencia o ausencia de SFB. Una vez madurados, grupos de oocitos fueron destinados para la evaluación de sus niveles de actividad mitocondrial mediante el uso del colorante fluorescente JC-1. Grupos de oocitos madurados con y sin suero, fueron fertilizados y cultivados *in vitro* para evaluar sus tasas de desarrollo hasta el estadio de mórula. Se realizaron comparaciones estadísticas entre los tratamientos mediante la prueba t de Student. Los resultados evidenciaron una proporción estadísticamente mayor ($P < 0.05$) de actividad mitocondrial en oocitos previamente madurados en un medio sin suero ($44.4 \pm 1.82\%$), respecto a oocitos madurados en presencia de suero ($31.2 \pm 1.42\%$). Las tasas de producción *in vitro* de mórulas, fueron superiores estadísticamente ($P < 0.05$) para el tratamiento de maduración sin suero, respecto a la maduración con suero ($34.8 \pm 3.70\%$ vs. $24.5 \pm 3.12\%$, respectivamente). Se concluye que la presencia de SFB en el medio para la maduración *in vitro* de oocitos bovinos, ejerce un efecto deletéreo sobre su actividad mitocondrial y su tasa de desarrollo embrionario *in vitro*.

Palabras clave

Oocitos, producción *in vitro* de embriones, suero fetal bovino, actividad mitocondrial.

Summary

To evaluate the fetal calf serum (FCS) effect during *in vitro* maturation of bovine oocytes on their mitochondrial activity and *in vitro* development, bovine oocytes were recovered from ovaries collected at the local slaughterhouse. Oocytes were *in vitro* matured in SOFaa medium in absence or presence of FCS. Matured oocytes were tested for mitochondrial activity with JC-1 dye staining. Also matured oocytes groups were *in vitro* fertilized and cultured to evaluate percentage of development to the morulae stage. Statistic comparison between groups were analyzed using a Student t test. Results indicate a significantly higher proportion mitochondrial activity ($P < 0.05$) in oocytes without serum-matured than those oocytes serum-matured ($44.4 \pm 1.82\%$ and $31.2 \pm 1.42\%$, respectively). Morulae

¹ Integrantes del Grupo de Biotecnología Animal, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

² Integrante del Grupo de Investigación en Biotecnología Animal (GIBA), Politecnico Colombiano JIC.

E-mail: grestrepo@elpoli.edu.co

production rates were significantly higher ($P < 0.05$) in oocytes without serum-matured than oocytes serum-matured ($34.8 \pm 3.70\%$ vs. $24.5 \pm 3.12\%$, respectively). We concluded that the presence of FCS in medium during bovine oocyte *in vitro* maturation, can affect mitochondrial activity and embryo *in vitro* development.

Key words

Oocytes, *in vitro* embryo production, fetal calf serum, mitochondrial activity.

Introducción

La suplementación de la maduración *in vitro* de oocitos bovinos con suero fetal bovino y otros sueros, es una práctica muy extendida dentro de los protocolos de producción *in vitro* de embriones bovinos^(1,2,3). El suero fetal es en general considerado como una fuente de nitrógeno para los embriones preimplantatorios⁽⁴⁾, sin embargo éste contiene un amplio grupo de moléculas definidas y no definidas que ejercen diversos efectos sobre el desarrollo *in vitro* de los embriones a través de nutrientes, hormonas, quelantes de metales pesados y factores de crecimiento, como algunos de sus principales componentes^(5,6). Dichos efectos han sido caracterizados desde benéficos en la competencia para el desarrollo de oocitos y embriones por los aportes de las moléculas mencionadas, hasta contraproducentes para el desarrollo *in vitro*, la morfología embrionaria, la criótolerancia, la actividad mitocondrial, la expresión génica, y el desarrollo fetal y postnatal en las crías resultantes de los embriones transferidos⁽⁷⁻¹⁵⁾. A nivel celular se ha fijado la atención en la incorporación de lípidos desde el suero como posible causante de alteraciones en el desarrollo embrionario, pues la presencia de suero en el medio de cultivo ha sido referida como responsable de una excesiva acumulación de lípidos en oocitos y embriones⁽¹⁶⁻¹⁹⁾, lo cual se manifiesta por la apariencia oscura de su citoplasma⁽¹⁰⁾, y se ha relacionado con bajas tasas de producción de blastocistos^(20,21). El mecanismo por el cual se da dicha acumulación en embriones bovinos aún no ha sido aclarado, sin embargo se conoce que células en cultivo pueden tomar ácidos grasos, fosfolípidos y triglicéridos desde medios suplementados con suero y que la mayoría de los lípidos son derivados de triglicéridos contenidos en lipoproteínas séricas^(6,13). Se ha sugerido que la excesiva acumulación de lípidos citoplasmáticos en oocitos y embriones conduce a cambios en su contenido de lípidos y en su composición de ácidos grasos, lo cual puede estar asociado a trastornos en el metabolismo mitocondrial^(9,13) pues se conoce que embriones cultivados en medios suplementados con suero, poseen mitocondrias inmaduras en comparación a aquellos

cultivados en medios libres de suero⁽¹³⁾. Estos hallazgos revisten importancia ya que observaciones indican que las mitocondrias son funcionalmente trascendentes para los oocitos y el desarrollo embrionario temprano, pues se sugiere una relación funcional entre la fosforilación oxidativa, la producción de ATP y el desarrollo embrionario⁽²²⁻²⁹⁾, y se ha propuesto que la pérdida de actividad mitocondrial en oocitos puede contribuir al bajo desarrollo embrionario durante la producción *in vitro*⁽³⁰⁻³⁴⁾ y a las bajas tasas de preñez post-transferencia^(35,36). De acuerdo a éste panorama, para esta investigación se plantea como hipótesis, que las fallas en el desarrollo embrionario *in vitro* de oocitos bovinos pueden ser el resultado de alteraciones mitocondriales representadas por descensos en las proporciones de mitocondrias de alta actividad, causadas por la suplementación de la maduración *in vitro* con suero fetal bovino. Por lo cual cobra gran importancia la determinación de los niveles de actividad mitocondrial en oocitos maduros destinados para la fertilización y el desarrollo *in vitro*.

Materiales y métodos

Recolección de ovarios y complejos cúmulus-oocito

Los oocitos bovinos fueron recuperados desde ovarios de hembras provenientes de la planta de faenado local, transportados en solución salina (NaCl 0,9%) a 38 °C, y procesados en el laboratorio dentro de las tres horas posteriores a la recolección. Los folículos entre 2 y 6 mm fueron aspirados usando una jeringa de 5 ml con una aguja calibre 18. Los complejos cúmulus-oocito (CCOs) y el fluido folicular recuperados fueron puestos en tubos cónicos plásticos de 50 ml, dejándolos sedimentar durante 15 minutos a 37 °C para realizar la recuperación posterior de la fracción precipitada, desde la cual se seleccionaron solamente los complejos con características de ooplasma homogéneo, mínimo tres capas compactas de células

de la granulosa rodeando completamente al oocito, y morfología intacta. Los CCOs seleccionados fueron lavados en medio Hepes suplementado con 0.2mM piruvato de sodio (Sigma P5280) y 3mg/ml de albúmina sérica bovina fracción V (Sigma A9647).

Maduración *in vitro* de oocitos

Se establecieron dos tratamientos de maduración *in vitro* de oocitos. Para el primer tratamiento, denominado de maduración sin suero, los CCOs fueron incubados en grupos de 10 por gota de medio de maduración, donde cada gota de 50 μ l consistió en medio de fluido oviductal sintético (SOF) suplementado con 1X de medio esencial mínimo con aminoácidos no esenciales (MEMneaa, MEM Eagle Sigma M0268), 1X de medio esencial mínimo con aminoácidos esenciales (MEMeaa, BME Sigma B6766), 0.33 mM de piruvato de sodio, 1.5 mM de D-(+)-glucosa (Sigma G7021), 8 mg/ml de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (BSA FAF, Sigma A6003), LH (10 μ g/ml), FSH (10 μ g/ml), y 10 μ l/ml de solución antibiótica (100X ICN 1674046, penicilina 10.000UI/ml; estreptomycin 10mg/ml; anfotericina B 25mg/ml). Las gotas fueron cubiertas con aceite mineral (Sigma M8410) y preincubadas bajo condiciones de maduración por un mínimo de 3 h (38.5°C, 5% CO₂, con 100% de humedad), luego los CCOs fueron transferidos a las gotas, para ser incubados por 24 h (38.5°C, 5% CO₂ con 100% de humedad). Para el segundo tratamiento, denominado de maduración con suero, los CCOs fueron incubados igualmente en grupos de 10 por gota de medio, donde cada gota de 50 μ l de medio consistió en SOF suplementado de igual manera que el medio sin suero, más 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco BRL). Las gotas fueron cultivadas mediante el mismo procedimiento del tratamiento sin suero.

Determinación de la actividad mitocondrial de oocitos

Un total de 40 oocitos (repeticiones) para cada tratamiento de maduración *in vitro* (libre de suero y suplementado con suero), fueron cuantificados y evaluados para su porcentaje de fluorescencia. Sobre los oocitos madurados se utilizó el fluorocromo reportero de potencial de membrana interna mitocondrial JC-1 (5,5 6,6-tetracloro-1,1,3,3-yoduro de tetraetilbenzimidazolicarbocianina, Molecular Probes) a 1 μ g/ml en medio de maduración, con incubación a 38.5°C durante 25 minutos. Los dímeros de JC-1 formados a altos potenciales de membrana (>140mV) fueron observados mediante microscopía de fluorescencia (Carl Zeiss LR66238C) con un filtro de rodamina (máxima emisión 590 nm) BP 450-490, FT 510,

LP 515, que muestra un color rojo. Se realizó fotografía digital (Sony DSC-S85) de las emisiones fluorescentes observadas en los oocitos, las cuales fueron cuantificadas en unidades relativas por su densidad media mediante el programa Scion Image Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation), donde los valores mínimos de densidad correspondieron a la máxima fluorescencia, mientras los valores máximos de densidad correspondieron a la mínima fluorescencia, por lo cual posteriormente los valores encontrados fueron invertidos, y transformados a valores porcentuales por tratarse de unidades relativas, tomando como referencia los valores de fluorescencia de los controles positivo (en células de la granulosa) y negativo (en imágenes sin fluorescencia alguna), los cuales correspondieron a los valores de 100% y 0%, respectivamente.

Fertilización y cultivo *in vitro*

Los oocitos madurados en medios con y sin suero, fueron lavados en Hepes suplementado y puestos en medio de fertilización preincubado, donde cada gota de 50 μ l fue constituida por medio FERT-TL con 1.0 μ M de piruvato de sodio, 6mg/ml de BSA-FAF y 2X de MEMneaa, y fue suplementada al momento de la inseminación con 2 μ l de PHE (penicilamina 2mM, epinefrina 250 mM, hipotaurina 1mM) y 2 μ l de heparina (10 μ g/ml). Posteriormente los oocitos fueron inseminados con semen criopreservado el cual se descongeló a 37°C y fue seleccionado mediante la técnica de gradiente doble de percoll, y diluido a una concentración de 1 millón de espermatozoides por mililitro. Se permitió la interacción entre oocitos y espermatozoides durante 18 horas a 38.5°C, 5% CO₂ y humedad máxima. A las 18 horas post-inseminación (hpi) los presuntos cigotos fueron desnudados de las células del cúmulus y cultivados durante 72 horas en gotas de 50 μ l de medio de cultivo constituido por SOF suplementado con 1X de MEMneaa, 1X de MEMeaa, 8mg/ml de BSA-FAF, 0.33mM de piruvato de sodio, 1.5 mM de D-(+)-glucosa, 0.1 mM de EDTA (Sigma E6758), 0.1mM de taurina (Sigma T8691) y 10 μ l/ml de solución antibiótica (100X ICN 1674046, penicilina, 10.000UI/ml; estreptomycin 10mg/ml; anfotericina B 25mg/ml). Se evaluaron las tasas de desarrollo obtenidas hasta el estado de mórula a partir de un total de 220 oocitos distribuidos en unidades experimentales de 10 oocitos, derivados de cada tratamiento de maduración (con y sin suero).

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue comprendido por una valoración estadística descriptiva y por la comparación de los grupos mediante una prueba t de Student, en lo relacionado con la actividad mitocondrial y el desarrollo *in vitro* de los oocitos bovinos. Todos los análisis fueron realizados mediante el programa Statgraphics Plus 3.0 (Statistical Graphics Corporation).

Resultados

Actividad mitocondrial de oocitos bovinos madurados *in vitro*

Los resultados obtenidos mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) para la actividad mitocondrial entre los tratamientos de maduración *in vitro*. Se evidenció superioridad estadística en la actividad mitocondrial de los oocitos madurados en un medio sin suero, respecto a los oocitos madurados en un medio con suero. En la Tabla 1 se presentan los valores estadísticos para los resultados obtenidos.

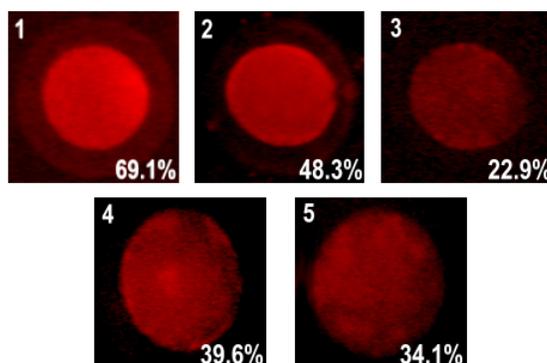
Tabla 1. Valores estadísticos para el porcentaje de fluorescencia (actividad mitocondrial) de oocitos frescos.

Parámetro* / Tratamiento	Sin Suero	Con Suero
Número de oocitos	40	40
Promedio \pm DS	44.4 ^a \pm 11.5	31.2 ^b \pm 9.0
Error Estándar	1.82	1.42

*Valores en unidades relativas (% de fluorescencia). ^{a,b} Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos. DS: desviación estándar.

Fueron encontrados rangos (valores mínimos y máximos de fluorescencia) para oocitos madurados con suero y sin suero respectivamente de 13.8% a 56.6% y 20.8% a 71.2%. Los valores de fluorescencia encontrados corresponden a las proporciones de detección de mitocondrias con altos niveles de actividad mitocondrial o potencial de membrana mitocondrial ($>140\text{mV}$). La Figura 1 muestra oocitos de ambos tratamientos de maduración con diferentes niveles de actividad mitocondrial.

Figura 1. Oocitos evaluados para actividad mitocondrial (JC-1), con diferentes intensidades de fluorescencia. 1, 2 y 3. Oocitos madurados en medio sin suero; 4 y 5. Oocitos madurados en medio con suero. En la parte inferior se muestra el porcentaje de fluorescencia calculado para cada oocito.



La Figura 2 muestra un histograma comparativo de la distribución de los oocitos madurados por ambos tratamientos, según su porcentaje de fluorescencia (actividad mitocondrial). La distribución de los niveles de actividad mitocondrial entre los dos tratamientos de maduración muestran como para oocitos madurados en un medio sin suero se encuentra una considerable mayor proporción de oocitos en los rangos superiores de actividad mitocondrial expresada como porcentaje de fluorescencia.

Figura 2. Histogramas de la distribución de oocitos madurados con y sin suero según sus porcentajes de fluorescencia (actividad mitocondrial).



Tasas de desarrollo a partir de oocitos madurados *in vitro*

Los resultados muestran una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) para las tasas de producción de mórulas entre los tratamientos de maduración *in vitro*. Mostrando superioridad en la tasa de producción de mórulas a partir de los oocitos madurados en un medio sin suero, respecto a los oocitos madurados en un medio con suero. La Tabla 3 muestra los datos estadísticos para los resultados obtenidos.

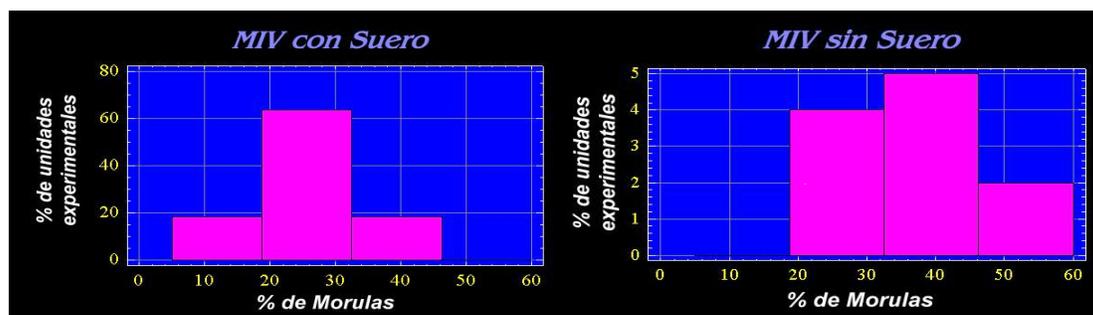
Tabla 3. Valores estadísticos para las tasas de desarrollo *in vitro* de mórulas.

Parámetro* / Tratamiento	Sin Suero	Con Suero
**Número	11	11
Promedio \pm DS	34.8 ^a \pm 12.2	24.5 ^b \pm 10.3
Error Estándar	3.70	3.12

*Unidades en % de producción de mórulas sobre cada unidad experimental; **Número de unidades experimentales. ^{a,b} Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos. DS: desviación estándar.

La distribución de las tasas de producción de mórulas entre los dos tratamientos de maduración muestra como para oocitos madurados en un medio sin suero se encuentra una considerable mayor proporción de oocitos en los rangos superiores de desarrollo *in vitro*. La Figura 3 muestra un histograma comparativo de la distribución de las unidades experimentales para las tasas de desarrollo.

Figura 3. Histogramas de la distribución por unidades experimentales de las tasas de desarrollo *in vitro* de mórulas a partir de oocitos madurados con y sin suero.



Discusión

El papel del suero fetal bovino en la maduración y el posterior desarrollo *in vitro* de oocitos de diferentes especies de mamíferos, no ha sido completamente dilucidado a pesar del extendido uso de este suplemento para la producción *in vitro* de embriones. Su composición hasta cierto punto desconocida, la variabilidad en la misma como reflejo de la diversidad en su origen, y los problemas derivados de su uso, tanto en oocitos y embriones como en las crías resultantes; han hecho que sea imprescindible el estudio detallado de su efecto sobre las diferentes estructuras celulares y sobre los diferentes aspectos que afectan la viabilidad y el éxito del desarrollo embrionario.

Múltiples estudios han establecido la importancia de las mitocondrias y sus niveles de actividad durante los estadios de desarrollo tempranos en los embriones bovinos, relacionando dicha actividad con los niveles de producción de substratos energéticos como el ATP, el cual es vital para una óptima competencia para el desarrollo embrionario *in vitro*.

En apreciaciones de Kim *et al.* ⁽⁹⁾, Abe *et al.* ⁽¹⁶⁾, Ferguson y Leese ⁽¹⁷⁾ y Fair *et al.* ⁽¹⁸⁾, se ha caracterizado como el cultivo de oocitos y embriones en presencia de suero, es responsable de la incorporación excesiva a través de lipoproteínas séricas, de ácidos grasos, fosfolípidos y triglicéridos en el citoplasma de dichas células, lo cual podría generar cambios en los perfiles lipídicos de las mismas, además de ser posiblemente causante de alteraciones en la estructura mitocondrial (Mucci *et al.* ⁽⁶⁾ Abe y Hoshi ⁽¹³⁾, Sata *et al.* ⁽¹⁹⁾, por lo cual dichos autores han sugerido a este fenómeno como responsable de alteraciones en el metabolismo mitocondrial. En esta investigación se demuestra que existe un efecto contraproducente del suero fetal bovino sobre la actividad mitocondrial de oocitos bovinos madurados en presencia de dicho suplemento.

El hallazgo de una relación directa entre la presencia de suero en la maduración *in vitro* de oocitos bovinos y los niveles cuantificados de actividad mitocondrial, cobra gran importancia considerando que dicha relación en otras investigaciones solo había sido sugerida como una posibilidad, o había sido planteada sin la cuantificación directa de la actividad mitocondrial.

Es relevante considerar que la alteración en la actividad mitocondrial de los oocitos a causa de su cultivo con

suero fetal bovino, puede comprometer de forma negativa las tasas de desarrollo embrionario *in vitro*, tal como lo demuestran nuestros resultados. Por consiguiente es importante reevaluar el uso de dicho suplemento en el desarrollo embrionario *in vitro*, al menos en los estadios más tempranos de desarrollo.

Conclusiones

Se concluye que bajo las condiciones de esta investigación, la suplementación de los medios de maduración *in vitro* con suero fetal bovino, tiene un efecto deletéreo sobre la actividad mitocondrial y el desarrollo *in vitro* de los oocitos bovinos, lo cual hace que sea indeseable la incorporación de suero en los medios de cultivo, y hace necesario para la producción *in vitro* de embriones, el uso de medios definidos en los cuales para cada uno de sus componentes estén debidamente caracterizados los efectos sobre el desarrollo embrionario.

Agradecimientos

Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín y su Laboratorio de biotecnología animal; profesores Guillermo Henao Restrepo y Omar Camargo Rodríguez.

BIBLIOGRAFÍA

1. Duran D. Technical aspect of *in vitro* embryo production. Embryo technology laboratory Phylippine Carabao Center (1999).
2. Gandhi A, Lane M, Gardner D, Krisher R. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Human Reproduction* 2000;15(2):395-401.
3. Ali A, Sirard A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Biology of Reproduction* 2002;66:901-905.
4. Keskinetepe L, Brackett B. *In vitro* developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biology of Reproduction* 1996;55:333-339.
5. Gardner D, Lane M. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Human Reproduction* 1998;13:148-159.
6. Mucci N, Aller J, Kaiser G, Hozbor F, Albeiro R. Producción *in vitro* de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Archivos de Medicina Veterinaria* 2006;38(2):97-104.
7. Hansen P, Block J. Towards an embryocentric world: the current and potential uses of embryo technologies in dairy production. *Reproduction, Fertility and Development* 2004;16:1-14.
8. Massip A. Cryopreservation of bovine oocytes: Current status and recent developments. Minireview. *Reproduction Nutrition Development* 2003;43:325-330.
9. Kim J, Kinoshita M, Ohnishi M, Fukui. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes. *Reproduction* 2001;122:131-138.
10. Leroy J, Genicot, G, Donnay I, Van Soom A. Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with Nile red: a practical approach. *Reproduction of Domestic Animals* 2005;40:76-78.
11. Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Murakami M, *et al.* Cryopreservation of mature bovine oocytes following centrifugation treatment. *Cryobiology* 1997;34:36-41.
12. Sturmey R, Leese H. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction* 2003;126:197-204.
13. Abe, H; Hoshi, H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum free media. *Journal of Reproduction and Development* 2003;49(3):193-202.
14. Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Pérez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland M, Lonergan P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implication for blastocysts development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction* 2003;68:236-243.
15. Lazzari G, Wrenzycki C, Hermann D, Duchi R, Kruip T. *et al.* Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biology of Reproduction* 2002;67:767-775.
16. Abe H, Yamashita S, Itoh T, Satoh T, Hoshi H. 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* 1999;53:325-335.

17. Ferguson E, Leese H. Tryglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *Journal Reproduction and Fertility* 1999;116:373-378.
18. Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, Cottell D, Hyttel P, *et al.* Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. *Molecular Reproduction and Development* 2001;58:186-195.
19. Sata R, Tsujii H, Abe H, Yamashita S, Hoshi H. Fatty acid composition of ovine embryos cultured in serum-free and serum-containing medium during early embryonic development. *Journal of Reproduction and Development* 1999; 45(1):97-103.
20. Hawk H, Wall R. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology* 1994;41:1571-1583.
21. Bilodeau-Goeseels S, Pacich P. Effects of quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Animal Reproduction Science* 2002;71:143-155.
22. Bavister B, Squirrell J. Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. *Human Reproduction* 2000;15(suppl 2):189-198.
23. Van Blerkom J, Davis P, Mathwig V, Alexander S. Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos. *Human Reproduction* 2002;18:2429-2440.
24. Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. Inner mitochondrial membrane potential, cytoplasmic ATP content and free Ca(2+) levels in metaphase II mouse oocytes. *Human Reproduction* 2003;17(2):393-406.
25. Tamassia M, Nuttinck F, May-Panloup P, Reynier P, Heyman Y, *et al.* In Vitro Embryo Production Efficiency in cattle and its association with oocyte adenosine triphosphate content, quantity of mitochondrial DNA, and mitochondrial DNA haplogroup. *Biology of Reproduction* 2004;71:697-704.
26. Tarazona A, Rodríguez J, Restrepo L, Olivera-Angel M. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced *in vitro*. En: *Reproduction in Domestic Animals* 2006;41(1):5-11.
27. Stojkovic M, Machado S, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, *et al.* Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: Correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biology of Reproduction* 2001;64:904-909.
28. Wilding M, Fiorentino A, De Simone M, Infante V, De Matteo L, *et al.* Energy substrates, mitochondrial membrane potential and human preimplantation embryo division. *Reproductive BioMedicine Online* 2002;5:39-42.
29. Wilding M, De Placido G, De Matteo L, Marino M, Alviggi C, *et al.* Chaotic mosaicism in human preimplantation embryos is correlated with a low mitochondrial membrane potential. *Fertility and Sterility* 2003;79:340-346.
30. Van Blerkom J. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction* 2004;128:269-280.
31. Thouas G, Trounson A, Wolvetang E, Jones G. Mitochondrial dysfunction in mouse oocytes result in preimplantation embryo arrest in vitro. *Biology of Reproduction* 2004;71:1936-1942.
32. Acton B, Jurisicova A, Jurisica I, Carper R. Alterations in mitochondrial membrane potential during preimplantation

stages of mouse and human development. *Molecular Human Reproduction* 2004;10:23-32.

33. Au H, Yeh T, Kao S, Tzeng C, Hsieh, R. Abnormal mitochondrial structure in human unfertilized oocytes and arrested embryos. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005;1042:177.

34. Jones A, Van Blerkom J, Davis P, Toledo A. Cryopreservation of metaphase II human oocytes effects in mitochondrial membrane potential: implications for developmental competence. *Human Reproduction* 2004;19(8):1861-1866.

35. Thompson J, Peterson A. Bovine embryo culture in vitro: new developments and post-transfer consequences. *Human Reproduction* 2000;15(suppl 5):59-67.

36. Hasler JF. *In-vitro* production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. *Human Reproduction* 2000;15(suppl 5):47-58.

EL CENTRO DE VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TE DA MUCHO MÁS

Por eso
extendimos el horario
de lunes a viernes
hasta las

10pm

Sabados de 8 am a 8 pm
Domingos de 8 am a 6 pm



NUESTROS SERVICIOS

- ◆ Consulta general y especializada
- ◆ Cirugía
- ◆ Cirugía por laparoscopia
- ◆ Hospitalización
- ◆ Ayudas diagnósticas
- ◆ Laboratorio clínico veterinario
ICMT-CES
- ◆ Servicio de transporte
- ◆ Almacén agropecuario
- ◆ Asesoría zootécnica



UNIVERSIDAD CES

Un Compromiso con la Excelencia

Resolución del Ministerio de Educación Nacional No. 1371 del 22 de marzo de 2007

Kilometro 4 Loma El Escobero Envigado - Antioquia Teléfono (57) (4) 336 0260

www.ces.edu.co