

## Desarrollo embrionario de bovino *in vitro* cocultivado con células oviductales y del *cumulus oophorus*



### *In vitro*-fertilized bovine embryos co-cultured with oviductal and *cumulus oophorus* cells

<http://opn.to/a/mgHn7>

Yury Grisel Soto-Martínez<sup>1</sup>, Eduardo Casas-Hernández<sup>2</sup>, José Miguel Betancourt-Rule<sup>2</sup>, Filiberto Fernández-Reyes<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Maestría en Biología Experimental. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, 09340 D.F., México.

<sup>3</sup>Departamento de Producción Agrícola y Animal, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, 04960 D.F., México.

**RESUMEN:** La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto del cocultivo de los embriones con células oviductales y del cúmulo oóforo (*cumulus oophorus*) sobre el desarrollo de embriones *in vitro* en estadio de blastocisto. Los oviductos y ovarios se colectaron de hembras bovinas sacrificadas en un rastro. Las células oviductales se obtuvieron tras una incisión longitudinal del oviducto; las células del *cumulo oophorus* se colectaron del líquido folicular. Ambos tipos celulares se colocaron para su cultivo en TCM-199 con 20 % de Suero Fetal Bovino (SFB). Los complejos cúmulo-ovocitos (COC's) fueron colectados por aspiración de folículos de 2 a 7 mm de diámetro y colocados para su maduración en TCM-199 con 10 % de SFB; posteriormente, se fertilizaron utilizando una concentración de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Después de la fertilización se dividieron en tres tratamientos: 1) Control, 2) Cocultivo con células de cúmulo, 3) Cocultivo con células del oviducto. El desarrollo se evaluó a 192 horas de cultivo *in vitro*, determinando la cantidad de embriones divididos, mórulas y blastocistos. Se cultivaron en medio SOF secuencial, por tratamiento: 1) 538 ovocitos, 2) 627 ovocitos y 3) 478 ovocitos. Los resultados fueron los siguientes: 14 % de blastocistos en el cocultivo de células cúmulo, 7 % en el cocultivo de oviducto y 4 % en el control, con una diferencia estadística significativa ( $p < 0,05$ ) entre los tres tratamientos. Se concluye que el uso de medios condicionados con células somáticas puede estimular el desarrollo *in vitro* hasta estadio de blastocisto de los embriones bovinos.

**Palabras clave:** desarrollo embrionario, bovino, *in vitro*, cocultivo.

**ABSTRACT:** The research was aimed at evaluating the effect of embryos co-cultured with oviductal and *cumulus oophorus* cells on the development of blastocyst *in vitro*. Oviducts and ovaries were collected from slaughtered bovine females. Oviductal cells were obtained after a longitudinal incision of the oviduct and cumulus cells were collected from follicular fluid; both cell types were placed for culture in TCM-199 with 20 % Fetal Bovine Serum (FBS). The cumulus-oocyte complexes (COC's) were collected by the aspiration of follicles from 2 to 7 mm diameter and they were placed for maturation in TCM-199 with 10 % FBS. Subsequently, they were fertilized using a concentration of  $1 \times 10^6$  spermatozoa/mL. After fertilization, they were divided into three treatments: 1) Control, 2) Co-culture with cumulus cells and 3) Co-culture with oviduct cells. The development was evaluated at 192 hours of *in vitro* culture, determining the amount of divided embryos, morulas and blastocysts. They were cultured in sequential SOF medium by the treatment: 1) 538 oocytes, 2) 627 oocytes and 3) 478 oocytes. The results were the following: 14 % of blastocysts in the co-culture of cumulus cells, 7 % in the co-culture of oviduct and 4 % in the control, with a significant statistical difference ( $p < 0.05$ ) among the three treatments. It is concluded that the use of somatic cells in conditioned medium can stimulate the blastocyst stage development *in vitro* to the bovine embryos.

**Key words:** embryo development, bovine, *in vitro*, co-culture.

\*Autor para correspondencia: Filiberto Fernández-Reyes. E-mail: [fdzr2017@hotmail.com](mailto:fdzr2017@hotmail.com)

Recibido: 06/04/2018

Aceptado: 15/02/2019

## INTRODUCCIÓN

La principal limitación en la eficiencia de la producción de embriones de bovino *in vitro* es la maduración *in vitro* y el requerimiento de cocultivo para el desarrollo posterior a la fertilización, además de que no todos los ovocitos madurados son fecundados (1); aun cuando son fecundados, el desarrollo de blastocistos puede variar de 5 a 30 % (2,3). Los blastocistos producidos *in vitro* se consideran de menor calidad que los producidos *in vivo* (4); al ser de menor calidad se considera que el potencial de desarrollo disminuye (5).

Para el desarrollo *in vitro* de ovocitos de bovino se ha reportado que la temperatura más confortable es 38,5°C, ya que permite obtener blastocistos de calidad (6), además del requerimiento de medios específicos en cocultivo, los cuales pueden proporcionar sustancias como las proteínas moduladoras presentes en el oviducto que se requieren para el inicio del desarrollo del embrión bovino (7). En ausencia de cocultivo puede darse el bloqueo del desarrollo temprano, aunque no implica la muerte inmediata del embrión, pero sí constituye una situación irreversible (8). En el caso del bovino, el bloqueo en el desarrollo ocurre en el paso del embrión de 8 a 16 células (9). El bloqueo no es un fenómeno pasivo, sino que requiere la participación activa de rutas de señalización que demandan la activación del genoma embrionario, el acompañamiento de células somáticas produce compuestos con actividad mitogénica para las células embrionarias que favorecen la diferenciación celular y la eliminación o degradación de algunas sustancias embriotóxicas (10). Kussano *et al.* (11) plantean que el desarrollo posterior a la fertilización *in vitro* (FIV) depende de factores, como la presencia de los genes glypican 4 (GPC4), los cuales están presentes en los ovocitos que forman embriones; de igual forma, Córdova *et al.* (12) reportan otros tipos de genes.

Para promover la competencia de desarrollo de ovocitos de bovino y la subsecuente calidad de los embriones, se han aplicado sustancias como la piridoxina que inhibe la actividad de la catepsina B (CTBS) durante la maduración *in vitro* (IVM) y el cultivo *in vitro* (IVC) (13).

También se ha adicionado fluido oviductal de vesícula extracelular del istmo (14) y glucocorticoides (GCs), estos últimos benefician el desarrollo embrionario porque son importantes mediadores de eventos celulares clave, relacionados con la elevación de transcritores embrionarios que participan en el metabolismo de los lípidos y glucosa, así como en la respuesta al estrés celular (15). Por otra parte, el microambiente del ovocito puede influir en el grado de muerte de células del embrión (16). Sin embargo, el método de cultivo *in vitro* de embriones es un medio usado para reducir el riesgo de la transmisión de enfermedades al realizar la transferencia a los animales receptores (17).

Hay otras causas que pueden afectar el desarrollo, como es el pipeteo por sí mismo o la relación de los componentes orgánicos de muchos cultivos de tejidos sobre los cuales se desarrollan los embriones (18), así como el tamaño del folículo mediano y grande, el cual tiene un efecto negativo en la competencia de desarrollo de los ovocitos de bovino *in vitro* cuando está presente un CL en el ovario (19).

Por consiguiente, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del cocultivo de los embriones con células oviductales y del *cumulus oophorus* sobre el porcentaje de embriones *in vitro* en estadio de blastocisto, de manera cuantitativa y cualitativa en el modelo bovino, usando el medio SOF secuencial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los medios de cultivo utilizados se prepararon con reactivos de grado cultivo celular de Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo, USA) y diluidos en agua ultrapura Milli-Q. Los oviductos y ovarios se colectaron de hembras bovinas adultas sacrificadas en un rastro y se transportaron al laboratorio en solución salina al 0,9 % adicionada con antibiótico-antimicótico (penicilina G 10000 UI/mL, estreptomycin 10000 UI/mL y anfotericina 24 UI/mL) 1mL/L, a una temperatura de 30-35°C.

El cultivo de las monocapas se realizó una semana previa a la producción de los embriones *in vitro*. Los oviductos fueron lavados con PBS; posteriormente, haciendo una incisión se tomó un raspado de las células y se colocaron en

TCM-199 suplementado con 20 % de SFB (Suero Fetal Bovino. Las células del cúmulo *oophorus* se colectaron del líquido folicular posterior a la colección de los complejos cúmulo-ovocito (COC's), tomando para ello 100  $\mu$ L del sedimento y colocándolas en TCM-199 suplementado con 20 % de SFB, cubierto con aceite mineral para su incubación dentro de un ambiente con 5 % de CO<sub>2</sub>, 38,5°C y 90 % de humedad, con modificaciones del protocolo descrito por Goto *et al.* (20).

Los ovocitos se colectaron por aspiración de folículos de 2 a 7 mm de diámetro con medio TL-Hepes-PVA, a 38,5°C; posteriormente, se realizó la colección de los COC's, solamente los ovocitos clase I y II fueron incluidos en la investigación. Una vez seleccionados los COC's, se introdujeron en pozos de cultivo con 500  $\mu$ L de TCM suplementado con 10 % (v/v) de SFB, 0,5  $\mu$ g/mL de FSH y 0,5  $\mu$ g/mL de LH cubiertos con aceite mineral; se cultivaron por 24 horas dentro de un ambiente con 5 % de CO<sub>2</sub>, 38,5°C y 90 % de humedad (20).

Los ovocitos madurados se lavaron tres veces y se depositaron en 250  $\mu$ L de TBM; se procedió a fertilizarlos con semen criopreservado, el cual se descongeló a 38,5°C y en 3 mL de TBM; posteriormente, se centrifugó y el pellet resultante fue resuspendido en 1 mL de TBM e incubado 1 hora (*swim up*), con el sobrenadante. Finalmente se adicionó una concentración de  $1 \times 10^6$  espermatozoides por mL; se coincubaron durante 18 horas. Los probables cigotos fueron removidos de la placa de fertilización y lavados tres veces en medio de fertilización, con el fin de desprender la mayor cantidad de espermatozoides y células de granulosa aún pegadas; luego se lavaron tres veces más con medio de desarrollo SOF (Synthetic Oviductual Fluid) para su cultivo final (14).

El desarrollo de los embriones se evaluó en medio SOF secuencial, el cual se cambió cada 48 horas por 50 % de medio fresco, para evitar la acumulación de sustancias embriotóxicas. Los ovocitos fertilizados fueron divididos aleatoriamente en tres tratamientos de cocultivo: 1) Cultivo control, los embriones se incubaron en microgotas de 100  $\mu$ L de SOF, 2) Cultivo con células de cúmulo *oophorus*, los embriones se

incubaron en microgotas de 100  $\mu$ L sobre la monocapa de células granulosas con SOF; 3) Cultivo con células de oviducto, los embriones se incubaron en gotas de 500  $\mu$ L sobre la monocapa de células oviductales con SOF.

Los embriones fueron evaluados cada 24 horas para observar y registrar su desarrollo, hasta las 192 horas. Al finalizar el periodo de cultivo se registró el número de mórulas y blastocistos, tomando las características citadas por Robertson y Nelson (21).

La viabilidad se evaluó al finalizar el periodo de incubación para el desarrollo embrionario *in vitro*; se tomaron al azar algunos de los embriones en estadio de mórula y blastocisto de los tres tratamientos y se procedió a someterlos a tinción con MTT. Para ello se lavaron tres veces con 100  $\mu$ L de SOF y se colocaron en 300  $\mu$ L de solución de MTT para finalmente colocarlos en incubación a 38,5°C, durante una hora. La viabilidad se determinó bajo el siguiente criterio: embriones teñidos de color púrpura en más del 85 % de su volumen fueron considerados viables, los embriones sin tinción se consideraron no viables (22).

El diseño experimental utilizado en la presente investigación se llevó a cabo en un sistema completamente aleatorio, dividido en bloques y tratamientos, por lo que los resultados fueron evaluados estadísticamente usando la prueba de independencia de chi-cuadrada y mediante la prueba de comparación múltiple de Duncan, para la cual se utilizaron los programas de estadística NCSS-2007, PASS 2005 y GESS 2006 (23), usando un nivel de significancia estadística de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se cultivaron al azar 1,643 ovocitos en cada uno de los tres tratamientos: 1) Control: 538 ovocitos; 2) Cúmulo: 627 ovocitos; y 3) Oviducto: 478 ovocitos (Tabla 1). Del total de ovocitos cultivados, presentaron división 1,161 (71 %); el mayor porcentaje correspondió al cocultivo de células cúmulo.

El porcentaje de ovocitos divididos fue muy similar en los tres grupos, en tanto que el desarrollo embrionario en el grupo control presentó un mayor porcentaje 72 % ( $p < 0,05$ ) en el estadio de 2 a 8 blastómeros. El mayor

porcentaje de mórulas y blastocistos se obtuvo en los grupos cocultivados con células cúmulo (34 %) y (14 %), respectivamente ( $p < 0,05$ ) (Tabla 1).

Los resultados de viabilidad, en el día ocho de cultivo de las mórulas y blastocistos, indican que todos los embriones que llegaron al estadio de blastocisto fueron viables (100 %); en tanto, solo el 3 % de las mórulas del grupo cocultivado con células del cúmulo fue viable (Tabla 2).

El embrión en condiciones *in vivo* ejerce importantes interacciones paracrinas locales con el epitelio materno, que promueven su desarrollo hasta la etapa de blastocisto y subsecuente implantación (24), en el cultivo *in vitro* no existe la comunicación materno-embriónica, por consiguiente, el principal inconveniente es el mismo proceso de cultivo *in vitro* hasta el estadio de blastocisto, lo que sugiere que el cultivo de los embriones posfertilización es un periodo de importancia crítica en el proceso de producción de blastocistos (25). De la competencia de desarrollo del ovocito depende que los cigotos puedan desarrollar hasta blastocisto, pero también es importante el medio de cultivo seleccionado, porque de las condiciones de cultivo depende la cantidad y la calidad de los

embriones obtenidos (26). El desarrollo embrionario en medio de cultivo *in vitro* SOF sin suero fetal bovino o BSA, usando varios factores de crecimiento, citoquinas y otras moléculas surfactantes con propiedades embrióticas, como albúmina recombinante y ácido hialurónico, dio como resultado embriones con masa celular interna y número total de células, similar a los cultivados en medio SOF suplementado con albúmina (17).

La competencia de desarrollo del ovocito se adquiere durante la ovogénesis, durante esta se involucran diversos procesos moleculares como la activación o represión de genes, así como la síntesis y degradación de proteínas, los cuales brindan a los gametos femeninos su calidad para su desarrollo preimplantacional, implantación y gestación (27). Algunas sustancias han sido utilizadas para promover el desarrollo de los embriones de bovino, entre estas la glutatión (28), activador de plasminógeno (del tipo de urokinasa) (29) y vitamina C (30); esta última promueve la proliferación celular, disminuye los niveles de metilación de ADN en células donadoras y promueve la competencia de

**Tabla 1.** Desarrollo embrionario posfertilización *in vitro* de los ovocitos bovinos hasta el día ocho de cultivo./ *Embryonic development after in vitro fertilization of bovine oocytes until day eight of culture.*

Tratamiento con cocultivo	Ovocitos	Divididos (%)	Embriones (%)		
			2 a 8 Blastómeros	Mórulas	Blastocistos
Control	538	371 (69)	266 <sup>a</sup> (72)	92 <sup>a</sup> (25)	13 <sup>a</sup> (4)
Cúmulo	627	455 (73)	239 <sup>b</sup> (52)	153 <sup>b</sup> (34)	63 <sup>b</sup> (14)
Oviducto	478	336 (70)	214 <sup>c</sup> (64)	99 <sup>b</sup> (30)	23 <sup>c</sup> (7)
Total	1 643	1 161 (71)	724 (62)	344 (30)	93 (8)

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos.

**Tabla 2.** Evaluación de la viabilidad de los embriones producidos *in vitro* en estadio de mórula y blastocisto a los ocho días de cultivo *in vitro*./ *Evaluation of the viability of embryos produced in vitro at morula and blastocyst stage at eight days of in vitro culture.*

Estadio embrionario	Cocultivo	No viables (%)	Viables (%)
Mórula	Control	46	-
	Cúmulo	66	2(3 %)
	Oviducto	46	-
Blastocisto	Control	-	5(100 %)
	Cúmulo	-	21(100 %)
	Oviducto	-	9(100 %)
Total	195	158 (81)	37 (19)

desarrollo en la transferencia nuclear de células somáticas bovinas a embriones.

En el presente estudio se confirma que el cocultivo con las células proporcionó algunos elementos que contribuyeron a evitar el bloqueo en el desarrollo, de tal forma que los embriones alcanzaron la etapa de blastocisto dentro del tiempo establecido por la IETS (International Embryo Transfer Society) para obtener blastocistos viables y de calidad, es decir, a los ocho días de cultivo (21). En el acompañamiento en cocultivo es posible que la estimulación de las células cúmulo por adenosina cíclica 3'5'-monofosfato (cAMP), durante la maduración *in vitro* (IVM), mejore el desarrollo de los embriones, debido a su participación en la regulación del metabolismo celular, esteroidogénesis y expansión del cúmulo como lo reportan Khan *et al.* (31).

El porcentaje de embriones en estadio de mórula está dentro de los valores reportados por otros autores, que va de 13 a 49 % (20,32), aun cuando los embriones cultivados traspasaron el estadio de 8 a 16 células (9). Existen factores que pueden modificar el desarrollo, como elevados ácidos grasos no esterificados (NEFAs) *in vitro*, que ejercen un efecto negativo en las células de epitelio oviductal bovino en su fisiología (33). Asimismo, el tamaño del folículo mediano y grande tiene un efecto negativo en la competencia de desarrollo de los ovocitos de bovino *in vitro* cuando está presente un CL en el ovario (19). La adición de micro ARN al medio de cultivo de embriones en estado de mórula resulta en una disminución de 27,3 % en el desarrollo al estado de blastocisto (34). Por otra parte, cuando se encuentra un bajo índice de fragmentación en espermatozoides corresponde con la baja reacción del embrión al estado de blastocisto (35).

Aunque el porcentaje de división en el grupo control fue del 72 %, no fueron capaces de impulsar su desarrollo hasta estadio de blastocisto, como aquellos cultivados con células somáticas, tal como lo indica Shirazi *et al.* (36); solamente los embriones sometidos a cocultivo lograron alcanzar en mayor proporción el estadio de mórula y blastocisto, tanto en cantidad como en calidad. El análisis de estos resultados sugiere que el cocultivo de los embriones con células

somáticas contribuye a favorecer el ambiente, como lo reportan Orsi y Reischl (37). Se ha reportado que el medio de cultivo con monocapas de células de oviducto bovino (BOEC) aumenta la producción de blastocisto y, sobre todo, la calidad de los embriones resultantes (38). Asimismo, el incremento en el desarrollo de blastocistos está relacionado con los transcriptores embrionarios que participan en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos, tanto como la respuesta celular al estrés (15).

Las células de cúmulo favorecieron la división de los embriones y permitieron obtener una tasa de blastocistos de 14 %; en tanto, con el cocultivo de oviducto tuvo 7 %, lo cual puede deberse al cambio estructural y funcional que sufren las células de granulosa al estar en cultivo *in vitro*, como lo describen Familiari *et al.* (39) y Shirazi y Moalemian (40), quienes observaron que estas células pueden llevar a cabo una diferenciación celular y producir estrógenos y progesterona, como la producida por las células luteínicas que contribuyen a la preparación del ambiente materno para la gestación. De manera similar observaron Ferguson *et al.* (41), al adicionar progesterona al medio de cultivo, con lo que contribuía a acelerar el desarrollo embrionario a estadio de blastocisto, además de producir embriones de mayor diámetro. Se ha descrito que la monocapa de las células oviductales tiene efectos benéficos al modular el medio y las condiciones ambientales que rodean al embrión, pues son capaces de disminuir los niveles de oxígeno, previniendo con ello el deterioro del embrión ocasionado por los radicales libres; además, remueve sustancias embriotóxicas como el amonio y disminuye los niveles de iones y glucosa, que pueden dañar al embrión (24). Cuando las células se enfrentan a un estrés no realizan su función adecuadamente y arrojan mayor cantidad de desechos que pueden resultar tóxicos para los embriones en desarrollo, lo que se ve reflejado en una disminución del desarrollo (2). Las células somáticas en los cocultivos pueden metabolizar la glucosa en lactato y piruvato, proporcionándoles con ello, el sustrato energético necesario durante el desarrollo temprano (42).

El cultivo de embriones de mamíferos en volúmenes reducidos de medio o en grupos

incrementa significativamente el desarrollo de los blastocistos, el número de células y subsecuentemente la viabilidad después de su transferencia, debido a la producción de factores autocrinos/paracrinos derivados del embrión que estimulan el desarrollo. Un volumen muy grande resulta en la dilución de los factores haciéndolos poco efectivos (43).

Las células oviductales en cultivo no pierden su actividad embriotrófica; sin embargo, los diferentes métodos de cultivo pueden influenciar drásticamente en los atributos de las líneas celulares y el mantenimiento del contacto célula-célula y célula-monocapa puede ser interrumpida, fallando con ello la secreción de estradiol, lo cual altera la expresión del ARNm de oviductina; por tanto, debido a estos cambios no pueden mimetizar completamente el ambiente natural del oviducto bovino (44).

### CONCLUSIONES

Los embriones cultivados en monocapa de células de cúmulo alcanzan un mayor porcentaje de blastocistos, lo cual sugiere que sus características embriotróficas pueden mantenerse en mayor medida, al brindar con ello un ambiente más favorable al embrión; contrario a las células de oviducto, las cuales sobrellevan mayores cambios estructurales y posiblemente funcionales que les impiden poder brindar un ambiente materno apropiado al embrión. Es importante impulsar la realización de más investigaciones que contribuyan a revelar de manera precisa el mecanismo mediante el cual los cocultivos benefician el desarrollo embrionario *in vitro*.

### AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue parcialmente financiado por CONACYT (registro 001481). Agradecemos también al rastro Temamatla del Estado de México, por el apoyo al proporcionar el material biológico para la realización de este trabajo.

### REFERENCIAS

1. Mucci N, Aller J, Kaiser G, Hozbor F, Alberio R. Producción *in vitro* de embriones bovinos: Suplementación de los medios de cultivo con suero. Arch Med Vet. 2006;38:97-104.
2. López A, Olivera M, Ruiz T, Tarazona A. Efecto del co-cultivo sobre el desarrollo

- temprano de embriones bovinos producidos *in vitro*. Rev. MVZ Córdoba. 2007; 12:1061-1067.
3. Ahuja C, Montiel F, Pérez P, Gallegos J. Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos. Zootec Trop. 2009; 27:277-284.
4. Hirayama H, Moriyasu S, Kageyama S, Sawai K, Takahashi H, Geshi M, et al. Enhancement of maternal recognition of pregnancy with parthenogenetic embryos in bovine embryo transfer. Theriogenology. 2014;81:1108-1115
5. Bang JI, Jin JI, Ghanem N, Choi BH, Fakruzzaman M, Ha AN, et al. Quality improvement of transgenic cloned bovine embryos using an aggregation method: Effects on cell number, cell ratio, embryo perimeter, mitochondrial distribution, and gene expression profile. Theriogenology. 2015;84(4):509-523.
6. Suttiropattana T, Somfai T, Matoba S, Nagai T, Parnpai R, Geshi M. The effect of temperature during liquid storage of *in vitro*-matured bovine oocytes on subsequent embryo development. Theriogenology. 2016;85(3):509-518.
7. García EV, Hamdi M, Barrera AD, Sánchez-Calabuig MJ, Gutiérrez-Adán A, Rizos D. Bovine embryo-oviduct interaction *in vitro* reveals an early cross talk mediated by BMP signaling. Reproduction. 2017;153(5):631-643.
8. Valleh MV, Hyttel P, Rasmussen MA, Strøbech L. Insulin-like growth factor 2: A modulator of anti-apoptosis related genes (HSP70, BCL2-L1) in bovine reimplantation embryos. Theriogenology. 2014;82(7):942-950.
9. Tarazona A, Olivera-Angel M, Lenis Y. Rol de la mitocondria y el estrés oxidativo del desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*. Arch Med Vet. 2010;42:125-133.
10. Fields S, Hansen P, Ealy A. Fibroblast growth factor requirements for *in vitro* development of bovine embryos. Theriogenology. 2011;75(8):1466-1475.
11. Kussano NR, Leme LO, Guimarães AL, Franco MM, Dobe MA. Molecular markers

- for oocyte competence in bovine cumulus cells. *Theriogenology*. 2016;85(6):1167-1176.
12. Córdova A, Perreau C, Uzbekova S, Locatelli Y, Mermillo P. Development rate and gene expression of IVP bovine embryos cocultured with bovine oviduct epithelial cells at early or late stage of preimplantation development. *Theriogenology*. 2014;81:1163-1173
  13. Aboelenain M, Balboula AZ, Kawahara M, El-Monem Monaster A, Zaabel SM, Kim SW, et al. Pyridoxine supplementation during oocyte maturation improves the development and quality of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*. 2017;91:127-133.
  14. Lopera-Vasquez R, Hamdi M, Maillo V, Gutierrez-Adan A, Bermejo-Alvarez P, Ramírez MÁ, et al. Effect of bovine oviductal extracellular vesicles on embryodevelopmental and quality in vitro. *Reproduction*. 2017;153(4):461-470.
  15. Da Costa NN, Brito KN, Santana PD, Cordeiro MD, Silva TV, Santos AX, et al. Effect of cortisol on bovine oocyte maturation and embryo development in vitro. *Theriogenology*. 2016;85(2):323-329.
  16. Nuttinck F, Jouneau A, Charpigny G, Hue I, Richard C, Adenot P, et al. Prosurvival effect of cumulus prostaglandin G/H synthasa 2/prostaglandin2 signalig on bovine blastocyst: impact on in vivo posthatching development. *Biol Reprod*. 2017;96(3):531-541.
  17. Moreno D, Neira A, Dubreil L, Destrumelle S, Michaud S, Thorin C, et al. In vitro bovine embryo production in a synthetic medium: Embryo development, cryosurvival, and establishment of pregnancy. *Theriogenology*. 2015;84(7):1050-1060.
  18. Wale PL, Gardner DK. The effects of chemical and physical factor son mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Hum Reprod Update*. 2016;22(1):2-22.
  19. Karami S, Shahsavari MH, Hajarian H, Moghaddam G. In vitro developmental competence of bovine oocytes: Effect of corpus luteum and follicle size. *Iran J Reprod Med*. 2015;23(10):615-622.
  20. Goto K, Iwai N, Takuma Y, Nakanishi Y. Co-culture of in vitro fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *J Anim Sci*. 1992;70:1449-1453.
  21. Robertson I, Nelson R. Certification and identification of the embryo. In: Stringfellow DA, Seidel SM (Ed). *Manual of International Embryo Transfer*. Champaign, IL: IETS. 2011; pp.:103-117.
  22. Sigma. *Productos de investigación en ciencias de la vida*. México. 2001;pp.:23-1013.
  23. Hintze J. NCSS, PASS, and GESS. NCSS. Kaysville, Utah. <http://www.ncss.com>. 2006.
  24. Ulbrich S, Zitta K, Hiendleder S, Wolf E. In vitro systems for intercepting early embryo-maternal cross-talk in the bovine oviduct. *Theriogenology*. 2010;73:802-816.
  25. Mejía V, Arango S, Pareja A, Camargo O, Urrego R. Comparison of two culture media over the IVP of bovine embryos. *Revista CES. Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 2009;4:39-46.
  26. Bilodeau S, Panich P. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Anim Reprod Sci*. 2002;71:143-155.
  27. Zuccotti M, Merico V, Cecconi S, Redi C, Garagna S. What does it take to make a developmentally competent mammalian egg? *Human Reprod Update*. 2011;17(4):525-540.
  28. Sun WJ, Pang YW, Liu Y, Hao HS, Zhao XM, Qin T, et al. Exogenous glutathione supplementation in cultura medium improves the bovine embryo development after in vitro fertilization. *Theriogenology*. 2015;84(5):716-723.
  29. Chen H, Zhang L, Guo Z, Wang Y, He R, Qin Y, et al. Improving the development of early bovine somatic-cell nuclear transfer embryos by treating adult donor cells with vitamin C. *Mol Reprod Dev*. 2015;82(11):867-879.
  30. Urania F, Dovolou E, Rekkas CA, Heras S, Pappas I, Soom AV, et al. Urokinasa-type plasminogen activator dose not affect in vitro bovine embryo development and quality. *Act Vet Hung*. 2015;63(2):243-254.

31. Khan DR, Guillemette C, Sirard MA, Richard FJ. Transcriptomic analysis of cyclic AMP response in bovine cumulus cells. *Physiol Genomics*. 2015;47(9):432-442.
32. Pinyopummintry T, Bavister B. In vitro-matured/in vitro-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocyst in chemically defined, protein-free culture media. *Biol Reprod*. 1991;45:736-742.
33. Jordanes L, Arias-Alvarez M, Pintelon I, Thys S, Valckx S, Dezhkam Y, et al. Elevated non-esterified fatty acid concentrations hamper bovine oviductal epithelial cell physiology in three different in vitro culture systems. *Theriogenology*. 2015;84(6):899-910.
34. Kropp J, Khatib H. Characterization of microRNA in bovine in vitro culture media associated with embryo quality and development. *J dairy Sci*. 2015;98(9):6552-6563.
35. Wdowiak A, Bakalczuk S, Bakalczuk G. The effect of sperm DNA fragmentation on the dynamics of the embryonic development in intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Biol*. 2015;15(2):94-100.
36. Shirazi A, Ostad S, Ahmadi E, Heidari B, Shams N. In vitro development competence of ICSI-derived activated ovine embryos. *Theriogenology*. 2009;71:342-348.
37. Orsi M, Reischl J. Mammalian embryo co-culture: Trials and tribulations of a misunderstood method. *Theriogenology*. 2007;67:441-458.
38. Schmaltz-Panneau B, Locatelli Y, Uzbekova S, Perreau C, Mermillod P. Bovine oviduct epithelial cells differentiate partly in culture, while maintaining their ability to improve early embryo development rate and quality. *Reprod Domest Anim*. 2015;50(5):719-729.
39. Familiari G, Heyn R, Relucenti M, Nottola S, Sathananthan A. Ultrastructural Dynamics of Human Reproduction, from Ovulation to Fertilization and Early Embryo Development. *International Review of Cytology*. 2006;249:53-141.
40. Shirazi A, Moalemian Z. Ovine cumulus cells estradiol-17 $\beta$  production in the presence or absence of oocyte. *Anim Reprod Sci*. 2007;101:125-133.
41. Ferguson C, Kesler D, Godke R. Progesterone enhances in vitro development of bovine embryos. *Theriogenology*. 2012;77:108-114.
42. Rief S, Sinowatz F, Stojkovic M, Einspanier R, Wolf E, Prelle K. Effects of a novel co-culture system on development, metabolism and gene expression of bovine embryos produced in vitro. *Reprod*. 2002;124:543-556.
43. Gardner D, Lane M. Principles of Cloning. Chapter 6. Culture of viable mammalian embryos in vitro. Second Edition. Elsevier. USA. 2014;pp.63-84.
44. Schoen J, Bondzio A, Topp K, Einspanier R. Establishment and characterization of an adherent pure epithelial cell line derived from the bovine oviduct. *Theriogenology*. 2008;69:536-545.

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)