

EFFECTO DE TRES DIFERENTES FRACCIONES DE PESO MOLECULAR ALTO DEL MEDIO CONDICIONADO POR CÉLULAS BRL EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO Bovino In Vitro

*Roger Salgado O, José Barrera V, Samuel Correa Q, Luzardo Estrada L.
Universidad de Córdoba, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Medicina Animal
*Correspondencia: rodasaot@yahoo.es - A.A. 354, Montería, Colombia

RESUMEN

Para investigar la presencia de factores embriotróficos en el medio condicionado por células BRL (MCBRL), tres fracciones de peso molecular alto (>1, >5 y >10 Kda.) del MCBRL fueron adicionadas al medio TCM-199. Los oocitos fueron extraídos por el método de corte de ovarios de vacas sacrificadas en matadero, fueron madurados en una tensión del 5% de CO₂ en aire a 39°C por 24 horas en medio TCM-199 suplementado con suero de vaca en estro al 10%. Después de la maduración, los oocitos fueron lavados tres veces en medio TL-HEPES y transferidos a las gotas de fertilización. Los oocitos fueron fertilizados en gotas de 50 ml de medio TL-FERT bajo aceite mineral espermatozoides congelados-descongelados, seleccionados por Swim-up y capacitados con heparina. Después de 18 a 20 horas post-fertilización, los cigotos fueron cultivados en MCBRL (control), fracción >1, >5 y >10 KDa. Las diferentes fracciones del MCBRL incrementaron la proporción de embriones que alcanzaron el estado de divididos (2-8 células) después de tres días de cultivo (61-75%). La mayor proporción de embriones divididos fue alcanzada en la fracción > de 10 KDa. El desarrollo embrionario al estado de mórula/blastocisto no mostró diferencias significativas en las diferentes condiciones de cultivo (p>0.05). El recuento de núcleos no mostró diferencias significativas (P>0.05) en las diferentes condiciones de cultivo, con recuentos promedio en el rango de 15-23 células por embrión. En conclusión, los resultados muestran que la remoción de factores de peso molecular bajo del MCBRL mejoran el desarrollo embrionario al estado de divididos, pero es deficiente para promover el desarrollo mórula/blastocisto.

Palabras claves: Desarrollo embrionario, bovinos, medio condicionado, factores embriotróficos.

ABSTRACT

To investigate the presence of embryotrophic factors in conditioned media from BRL cells (CMBRL), three high molecular weight fractions (>1, >5, and >10 kd) were added to TCM-199 culture media. Oocytes were obtained by cutting ovaries from cows at slaughter houses, then they were matured under 5% CO₂ at 39° C for 24 hours in TCM-199 media, supplemented with 10% of estrous cow serum. After maturation, oocytes were washed three times in TL-HEPES media, and transferred to fertilization drops. Oocytes were fertilized in 50ml drops of TL-FERT media under mineral oil, with frozen-thaw sperm, selected by Swim-up and capacitated with heparin. Eighteen to 20 hours after fertilization, zygotes were cultivated in CMBRL media alone (control) or with either >1, >5, and >10 KDa fractions. The different fractions incorporated in CMBRL increased the proportion of embryo that reach division (2-8 cells) compared to control after three culture days (61-75%). The higher proportion of divided embryos was obtained with the >10 KDa fraction. Embryo development to morula/blastocyst stage and nuclei count did not show significant differences under different culture conditions (P>0.05). The number of cells per embryo varied between 15 and 23 cells per embryo. In conclusion, these results showed that removal of low molecular weight factors from CMBRL improve embryo development to the division stage, however it is deficient to promote the morula/blastocyst stage.

Key words: Embryo development, cattle, conditioned media, embryotrophic factors.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo embrionario bovino in vitro hasta la etapa de blastocisto ha sido posible en diferentes formulaciones de medios de maduración y fertilización, así como también, bajo diversos sistemas de cultivo embrionario. Sin embargo, cuando los embriones mamíferos son cultivados bajo condiciones subóptimas manifiestan un bloqueo en el desarrollo, que en el caso de los bovinos se presenta al estado de 8 - 16 células y ha sido atribuido a la falta de algunos componentes en el medio de cultivo o es causado por un ambiente inapropiado para el desarrollo embrionario. Ese bloqueo, en parte ha sido superado co-cultivando embriones con una variedad de células somáticas o con medios condicionados por esas células (Minami et al 1992, Vansteenbrugge et al 1994 y 1996). Sin embargo, los requerimientos nutricionales del embrión bovino temprano y el papel de las células en co-cultivo o en medio condicionado no está bien definido. Aunque algunos autores sugieren que el co-cultivo puede ejercer efectos debido a la secreción de factores embriotróficos por parte de las células somáticas y a la remoción de sustancias potencialmente dañinas o modificación de la concentración de los constituyentes del medio a niveles más apropiados para el desarrollo embrionario (Bavister 1992). Otros consideran que ese efecto se debe solo a la secreción de factores embriotróficos producidos por esas células los cuales ejercen un efecto estimulador para el desarrollo embrionario in-vitro (Bongso et al 1993).

Una forma de probar el efecto benéfico de las células somáticas es demostrar si las proteínas secretadas y aisladas de los cultivos de células, mejora el desarrollo embrionario al adicionarlas a un medio de cultivo convencional (Bavister 1995).

Ha sido demostrado por Vansteenbrugge et al (1994) que el medio condicionado por células BRL libre de suero, promueve el desarrollo embrionario in-vitro más allá del estado de 8 -16 células. Tal sistema de cultivo, podría facilitar la investigación del estudio de los factores embriotróficos no específicos del oviducto involucrados en el desarrollo embrionario temprano in-vitro.

El fin del presente estudio consistió en la evaluación de tres fracciones diferentes de peso molecular alto del medio condicionado por células BRL sobre el desarrollo embrionario bovino in vitro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del medio condicionado por células BRL (MCBRL)

Se utilizaron cultivos celulares de hígado de rata Buffalo (BRL 3A) de 5 semanas de edad (Coon 1968). Las células BRL fueron almacenadas a -196°C en una solución de 1.5M de dimetilsulfoxido (DMSO) en TCM-199 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS). Para la preparación del MCBRL se descongelaron dos crioviales (pase 1 y 6) en un baño de agua a 37°C aproximadamente por 2 minutos, luego se transfirieron a un frasco de cultivo de tejido de 25 cm^2 (Corning, cat. No. 25106-25) con 7 ml de medio de cultivo tibio (TCM199, M-2520/lot.34H46551 Sigma) con 10% FCS (F-3885/lot. Sigma) y un antimicótico (A-7292/lot.16H0298 Sigma) al 1%. Las células fueron cultivadas en una incubadora (Napco Cat. No. 5420-0) a 39°C , 5% de CO_2 en aire y humedad relativa alta.

El crecimiento de la monocapa de células BRL fue monitoreado por observaciones diarias con un microscopio invertido equipado con contraste de fase. Cuando las células alcanzaron confluencia, fueron lavadas tres veces con medio TCM-199, sin suero, las monocapas de células fueron cultivadas en TCM-199 libre de suero (5ml/frascos de 25 cm^2). El medio fue colectado y renovado cada 48 horas dos veces. Una vez obtenidas las cosechas de medio, se mezclaron y se centrifugaron a 800 gravedades, el sobrenadante se filtró por membranas de acetato de celulosa de 0.22 mm y se almacenó en tubos corning de 50 ml (25339) a -80°C y se denominó MCBRL.

Ultrafiltración del MCBRL

Se extrajeron tres fracciones diferentes >1 , >5 y >10 KDa. del MCBRL. Se utilizó un equipo de ultrafiltración, para cada experimento, 40 ml de MCBRL fueron ultrafiltrados mediante presión (30 psi) por un periodo de tiempo de 3 - 5 horas a 4°C a través de membranas centricon de 1 (SPECTRUM, 887-253) 5 (SPECTRUM, 887-255) y 10 KDa (SPECTRUM, 887-256). Al retenido, se le adicionaron 40 ml de TCM-199 y la suspensión fue ultrafiltrada de nuevo hasta obtener un volumen final de 5 ml conteniendo factores de peso molecular alto (>1 , >5 y >10 Kda). El contenido proteico de cada fracción fue cuantificado por el método del Acido Bicinchoninic (Sigma B 9643) y la concentración de

proteína fue ajustada a la del MCBRL. La integridad de las membranas fue verificada después de cada ultrafiltración, los pesos moleculares de las proteínas de cada retenido fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida, según el método descrito por (Schagger y Von 1987).

Maduración de oocitos (MIV) y fertilización in-vitro (FIV)

La colección de oocitos y MIV fueron realizadas por el método previamente descrito por Chacón en 1997. El medio de maduración consistió en: TCM-199, (M-2520 lot 34H46551 Sigma), con 0.026M de bicarbonato de sodio (S-5761/lot.85H1110) pH 7.4; suplementado con 10% (v/v) de suero de vaca en estro recolectado el primer día del estro e inactivado a 56° por 30 minutos; 0.2mM piruvato de sodio, (P-5280/ lot.70H-0800-5); 50mg/ml gentamicina, (G-1264/lot.42H06105 Sigma); y tres hormonas 80UI/ml HCG, (CG-10/lot 125H0745 Sigma); 1mg/ml de 17-b estradiol, (E-8875/lot.10H0065); y 45mg/ml de FSHp, (F-2293/lot.76H0746). Todos los cultivos fueron realizados con una tensión de 5% CO₂ en aire, a 39°C y humedad relativa alta.

Los ovarios de las vacas fueron colectados en un frigorífico y transportados al laboratorio en solución salina 0.9% (NaCl: Merck K22980804 lot 624) a una temperatura de 30-35°C. Los oocitos fueron obtenidos por el método de corte de los ovarios y lavados cinco veces en TCM-199. Grupos de 10-12 oocitos fueron transferidos dentro de gotas de 50ml en discos de cultivo estériles 60 x 15mm (C-6421) cubiertas con 10 ml de aceite mineral (M-8410 Sigma) previa estabilización de las gotas mínimo 2 horas y cultivados en una incubadora (NAPCO, Cat. No. 5420-0) por 24 horas a 39°C en una atmósfera de aire con 5% de CO₂ y una humedad relativa alta. Después de la maduración, los oocitos fueron lavados tres veces con TALP HEPES(Tyroides-albumin-lactate-piruvate Minimum Essential Medium) suplementado y dos veces con medio de fertilización y fueron transferidos grupos de diez oocitos en cada gota de 46 ul de medio de fertilización TALP FERT que contenía 10 mg de heparina/ml. El semen descongelado fue preparado por swim-up y los espermatozoides fueron adicionados a cada gota para una concentración final de semen de 1 x 10⁶/ml, en gotas de 50 ml. Los oocitos fueron cultivados en incubadora a 39°C, 5 % tensión de CO₂ y humedad relativa alta por 18 horas.

Cultivo embrionario

Los cigotos fueron removidos de las gotas de fertilización y transferidos en grupos de 40 a tubos de centrifuga cónicos de 15ml que contenían 1 ml de TALP-Hepes y agitados con vortex por 90 segundos para remover células del cumulus. Los cigotos completamente libres de células fueron lavados cinco veces en TALP-Hepes y 2 veces en gotas de 50ml de medio correspondiente a los tratamientos designados. Los cultivos fueron cubiertos con 10 ml de aceite mineral (M-8410 Sigma) en gotas de 25 ml, conteniendo alrededor de 30 cigotos y cultivados a 39°C en presencia de 5% de CO₂ de atmósfera y humedad relativa alta. Las proporciones de embriones divididos (2-8 células) fueron evaluadas al 3 día de cultivo y el número de embriones que alcanzó el estado de mórula/blastocisto en el día 7 de cultivo.

Análisis del número de células

Inmediatamente después del cultivo, los embriones en estado de mórula/blastocisto fueron teñidos (Hoechst 33342) de acuerdo al método descrito por Pursel et al (1985). Las preparaciones fueron examinadas usando un microscopio epifluorescente Nikon con un filtro de excitación de 330-380 nm y un filtro de barrera de 420 nm. El número de núcleos por embrión fue registrado. Debido a que algunos embriones se perdieron durante la manipulación, el número de embriones analizados no reflejó exactamente el número de mórulas producidas.

Evaluación de fracciones

Se investigó el efecto de adición de tres fracciones (>1, >5 y > 10 KDa) al medio TCM 199. La concentración de proteína de las fracciones fue ajustada a la del MCBRL. Los cigotos fueron asignados al azar a cada uno de los siguientes tratamientos: 1) MCBRL (Control) 2) TCM-199 suplementado con 0.17 mg/ml de retenido mayor de 1 KDa, 3) TCM 199 suplementado con 0.17 mg/ml de retenido mayor de 5 KDa y 4) TCM 199 suplementado con 0.17 mg/ml de retenido mayor de 10 KDa. Para cada tratamiento se evaluaron 10 réplicas constituida por una gota según lo descrito anteriormente.

Análisis estadístico

El porcentaje de embriones divididos (2-8 células) y el recuento de núcleos por embrión en estado de mórula/blastocisto se evaluaron por análisis de varianza y la significancia de las diferencias se analizó por la prueba de Duncan. El porcentaje de embriones que alcanzó el estado de mórula/blastocisto se evaluó por un análisis de Chi-cuadrado. La información fue procesada mediante el paquete de sistema de Análisis Estadístico - SAS-(Institute Inc., Cary, NC USA).

Resultados y discusión

Concentración de proteínas y electroforésis

El contenido de proteína total del MCBRL y las fracciones >1, >5 y >10 KDa fueron 0.17, 0.26, 0.35 y 0.30 mg/ml respectivamente. El análisis de la electroforesis reveló que la mayor concentración de

proteínas presentes en el MCBRL y en los retenidos de las diferentes fracciones del MCBRL estuvo por encima de los 10 KDa. Estos resultados son similares a los encontrados por Vansteenbrugge et al (1996), en medio condicionado de células de oviducto bovino.

Desarrollo embrionario

Los resultados de las diferentes fracciones del MCBRL sobre el desarrollo embrionario son presentados en la Tabla 1. El desarrollo embrionario al estado de divisiones (2-8 células) fue significativamente mas bajo (47%) en medio total comparado con las fracciones analizadas (61-75%) después de tres días de cultivo (P<0.05). La mayor proporción de embriones divididos fue alcanzada con la fracción mayor de 10 KDa. (75%) y fue significativamente diferente de las otras condiciones de cultivo (P < 0.05). Una misma tendencia fue observada por Liu et al (1995) en el ratón, trabajando con medio condicionado de células de oviducto humano.

Tabla 1. Efecto de las condiciones de cultivo sobre el desarrollo embrionario de oocitos bovinos madurados y fertilizados in-vitro

Condiciones de cultivo	Cigotos n	Divididos (2 - 8 células) n (%)	Mórula / blastocisto (%)
MCBRL	276	131(47) c	7(2.5) a
Fracción > 1 KDa	269	172(65) b	8(2.9) a
Fracción > 5 KDa	271	163(61) b	5(1.8) a
Fracción >10 KDa	279	211(75) a	4(1.4) a

Los porcentajes son expresados con base en el número de potenciales cigotos. Números con diferentes letras difieren significativamente (P < 0.05).

Al comparar el efecto de medio condicionado total, con las diferentes fracciones, se encontró que estos últimos son más eficientes para estimular el desarrollo embrionario temprano. Estas diferencias posiblemente se deban a la presencia de alguna sustancia negativa de bajo peso molecular presente en el MCBRL, como, el ión amonio, proveniente de la desaminación de aminoácidos durante la exposición del medio a las células. Al respecto Stojkovic et al., (1997) demostraron que concentraciones de amonio de 18 mg/ml (200mM) presentes en medio condicionado por células de oviducto bovino tuvieron una

correlación negativa sobre el porcentaje de embriones bovinos divididos. De igual forma Gardner et al (1994) encontraron la misma tendencia en embriones de ovejas.

El hecho de que la fracción mayor de 10 KDa fuera superior a las otras condiciones de cultivo sobre la tasa de embriones divididos, pudo deberse a que no se encontraban sustancias negativas de las que existen entre los pesos 1 y 10 KDa. Otra consideración podría ser una mayor concentración de proteínas con alto peso molecular con efecto positivo sobre el

desarrollo embrionario, tal como lo reportaron (Wegner y Killian 1991), (Boice et al 1992) y (Gandolfi 1994) quienes demuestran que un pequeño grupo de proteínas de origen oviductal, usualmente glicosiladas de pesos moleculares altos, al parecer participan en el desarrollo embrionario. Esas proteínas tienen la capacidad de atravesar la zona pelúcida y asociarse con las membranas de las blastómeras. Sin embargo, la función fisiológica hasta el momento permanece desconocida.

El desarrollo embrionario al estado de mórula/blastocisto (Tabla 1) no mostró diferencias significativas en las diferentes condiciones de cultivo ($P > 0.05$). Además, las proporciones de embriones que alcanzaron el estado de mórula/blastocisto fueron bajas en relación con los embriones que llegaron a los estados de divididos. Estos resultados estarían mostrando que estos medios apoyan el desarrollo embrionario hasta las primeras divisiones pero de ahí en adelante son insuficientes para continuar al estado de mórula/blastocisto, lo cual es consistente con lo comunicado por Ferry et al (1994) quienes reportaron con un medio que contenía células de oviducto bovino; un aumento marcado en el porcentaje de embriones divididos, sin embargo, los desarrollos del estado mórula/blastocisto fueron bajos. De igual forma, Reed et al (1995) encontraron que el medio condicionado por células BRL promovía el desarrollo embrionario al estado de mórula/blastocisto.

Lo anterior apoyaría la tendencia que se observa en la actualidad, en donde se ha venido incrementando el uso de sistemas de cultivo en dos pasos con el fin de obtener mejores resultados. Esto es demostrado por los trabajos de (Pinyopummintr y Bavister 1994, 1996) quienes obtuvieron buenos resultados en un sistema de cultivo de dos pasos, los primeros tres días con un medio definido químicamente para promover divisiones, seguido por un segundo paso donde se usa un medio complejo suplementado con suero para optimar el desarrollo a blastocisto.

En ninguno de los tratamientos, los embriones que se desarrollaron después de siete días de cultivo progresaron más allá del estado de mórula. El hecho que los embriones no llegaron al estado de blastocisto pudo ser debido a que el tiempo en que se evaluaron fue prematuro, (Grisart et al 1994, Rieger et al 1995). Otros autores describieron medios condicionados y escogieron el día ocho como punto de referencia, encontraron embriones que alcanzaron

el estado de blastocisto (Mermillod et al 1993, Vansteenbrugge et al 1994, 1996, Stojkovic et al 1997).

Los resultados del MCBRL (control) al estado de mórula/blastocisto (2.5%) fueron obtenidos con igual eficiencia a los reportados por Chacón (1997) en co-cultivo (2.6%) con células BRL, lo cual concuerda con los reportes de Van Inzen et al (1994); Hernández Ledezman et al (1996) en cuanto a la eficiencia de co-cultivo y medio condicionado con células BRL, pero, son inferiores a los reportados por Vansteenbrugge et al (1994) en el estado de mórula/blastocisto (18%).

Estas diferencias posiblemente se deban a: primero, a diferencias en los reactivos utilizados, esto es corroborado por los resultados obtenidos por Kane (1987), Bavister et al (1992), Nagao et al (1995) quienes argumentan que muchos de los problemas encontrados en diferentes laboratorios podrían ser debido a la variabilidad en los reactivos utilizados. Segundo, el sometimiento de los embriones a un estrés medio ambiental debido a que el cambio de medio de los mismos se realizaba el día tres post-inseminación conllevó posiblemente a un estado de bloqueo en el desarrollo, esto coincide con el periodo de transición del control del desarrollo materno al embrión (MCZT), que para el caso de los embriones bovinos ocurre durante el estado de 8 a 16 células. Esto se evidenció en los trabajos realizados por (Mermillod et al 1993, Trouson 1994, Vansteenbrugge et al 1994, 1996, Stojkovic et al 1997), quienes hicieron el cambio de medio el día dos post-inseminación y se obtuvieron mejores resultados.

En la presente investigación, con la fracción mayor de 10 KDa se obtuvieron tasas de desarrollo embrionario al estado de mórula/blastocisto ligeramente superiores a las reportadas por (Heyman Menezo 1987) quienes encontraron que la fracción mayor de 10 KDa del medio condicionado por vesículas trofoblásticas fue ineficaz en apoyar ese desarrollo, pero la fracción de peso molecular bajo fue efectiva. Estas diferencias posiblemente se deben al tipo de célula utilizado, de tal manera que los productos de secreción de las células al medio de cultivo son diferentes en su composición y por ende su efecto sobre el desarrollo embrionario también es diferente. Estos resultados fueron confirmados en ratones y se encontraron factores de peso molecular bajo de oviducto de esta especie y necesarios para alcanzar el estado de blastocisto, (Minami et al

1992); mientras que Liu et al (1995) demostraron que factores de peso molecular alto de oviducto humano mejoran el desarrollo embrionario de ratón.

Conteo celular

La calidad de los embriones desarrollados siete días después de cultivo fue valorada en términos del número total de núcleos presentes en el estado de mórula/blastocisto. Los resultados están resumidos en la Tabla 2. El análisis de esos datos muestra que no hubo diferencias significativas entre las condiciones de cultivo ($P > 0.05$).

Los resultados del control concuerdan con los reportados por Trounson et al (1994) y Rieger et al (1995). Esto puede ser debido a que cuando los embriones fueron cultivados en medios condicionados y presentaron un retardo en el desarrollo lo cual está asociado con una disminución en el subsecuente desarrollo potencial del embrión (Rieger et al 1995). Lo anterior se apoya con los trabajos realizados por Yadav et al (1993) quienes demostraron que los embriones bovinos que presentan un retardo en el desarrollo durante las primeras divisiones, tienen un número reducido de células en el estadio de blastocisto.

Tabla 2. Número de núcleos en mórula/blastocisto medidos después de 7 días de cultivo de cigotos bovinos madurados y fertilizados in-vitro

Condiciones de cultivo	No. de embriones examinados	No. de núcleos por embrión (media + DE)
MCBRL (control)	5	19 ± 2.1 a
Fracción > 1 KDa	5	20 ± 4.4 a
Fracción > 5 KDa	5	20 ± 3.2 a
Fracción > 10 KDa	2	15 ± 1.1 a

Números con diferentes letras son diferentes significativamente ($P < 0.05$)

En conclusión, bajo las condiciones de cultivo de este estudio los resultados indican que la remoción de factores de peso molecular bajo (< 10 KDa) del MCBRL incrementa significativamente el desarrollo al estado de 2-8 células, pero no así el desarrollo a mórula o blastocisto. Estos hallazgos confirman las últimas apreciaciones en donde se plantea la necesidad de sistemas de cultivo de dos fases para los embriones bovinos, teniendo en cuenta los

diferentes requerimientos de cultivo según el estado de desarrollo. Por lo anterior, y de acuerdo a lo informado por otros investigadores (Pinyopummin y Bavister 1994, 1996), es indispensable continuar con las investigaciones en sistemas de cultivo de dos pasos y establecer las mejores condiciones nutricionales y metabólicas durante el desarrollo embrionario in vitro.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bavister B.D. Co-culture for embryo development: is it really necessary?. *Human Reprod.* 1992; 7:339-1341.
2. Bavister B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum. Reprod* 1995; 1:91-148.
3. Boice M.L. Mavrogianis P.A, Murphy C.N, Verhage H.G. Prather R.S, Day B.N. Immunocytochemical analysis of the association of bovine oviduct-specific secretory glycoprotein with early embryos. *Theriogenology.* 1992; 37:194.
4. Bongso A, Fong C, Ratnam S. The search for improved in vitro system should not be ignored: embryo co-culture may be one of them. *Human Reprod.* 1993; 8:1155-1162.
5. Coon H.G. Clonal culture of differentiated rat liver cells. *J Cell Biol.* 1968; 39:29.
6. Chacón L. Evaluación de diferentes compuestos en la estandarización de la técnica de fertilización in vitro en bovinos. Tesis para optar al título de Magister Scientiae en Salud Animal y Producción Animal. 1997; Universidad Nacional Colombia.
7. Ferry L, Mermillod P, Massip A, Dessy F. Bovine embryo cultured in serum-poor oviduct-conditioned medium need cooperation to reach the blastocist stage. *Theriogenology.* 1994; 42:445-453.
8. Gandolfi F. Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. *Theriogenology.* 1994; 41:95-100.
9. Gardner D.K, Laner M, Spitzer A, Batt P. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: Amino acid vitamins and culturing embryos in grupo stimulate development. *Biol Reprod.* 1994; 50:390-400.
10. Grisart B, Massip A, Dessy F. Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. *Reprod* 1994; 101:257-264.
11. Hernández-Ledezman J.J, Villanueva C, Sikes D.J, Kubishch H.M. Increasing the rate of blastocyst formation and hatching from in vitro-produced bovine zygotes. *Theriogenology.* 1996; 46:961-969.
12. Heyman Menezo. In vitro cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using coculture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology.* 1987; 27:59-68.
13. Kane MT. In vitro growth of preimplantation rabbit embryo. En: Bavister BD (ed) *The Mammalian preimplantation Embryo.* New york: Plenum Press. 1987; 193-217.
14. Liu L, Chan S, Yeung W. Human oviductal cells produce high molecular weight factor(s) that improves the development of mouse embryo. *Mol Human Reproduc.* 1995; 10:2781-2786.
15. Mermillod P, Vansteenbrugge A, Wils A, Mourmeauz J.L, Massip A, Dessy F. Characterization of the embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos. *Biol Reprod* 1993; 49:582-587.
16. Minami N, Utsumi K, Iritani A. Effects of low molecular weight oviductal factors on the development of mouse one-cell embryos in vitro. *J Reprod. Fert.* 1992; 96:735-745.
17. Nagao Y, Saeki K, Hoshi M, Takahashi Y. Effects of water quality on in-vitro fertilization and development of bovine oocytes in protein-free medium. *Theriogenology.* 1995; 44:433-444.
18. Pinyopummintr T, Bavister B.D. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: Effects of type os serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology* 1994; 41:1241-1249.
19. Pinyopummintr T, Bavister B.D. Energy substrate requirements for in vitro development of early cleavage-stage bovine embryo. *Mol Reprod*

- Develop. 1996; 44:193-199.
20. Pursel V.G, Wall R.J, Rexroad C.E, Hammer R.E. and Brinster R.L. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryo. *Theriogenology*. 1985; 24:687-691.
 21. Reed W.A, Tae-Kwang S, Bunch T.D. and White K.L. Culture of in vitro fertilized bovine embryos with bovine oviductal epithelial cells, buffalo rat liver (BRL) cells, or BRL-cell-conditioned medium. *Theriogenology*. 1995; 45:439-449.
 22. Rieger D, Grisart B, Semple E, Van Langendonck A, Betteridge K.J, Dessy F. Comparison of the effects of oviductal cell co-culture and oviductal cell-conditioned medium on the development and metabolic activity of cattle embryos. *J Reprod. Fert.* 1995; 105:91-98.
 23. Schagger H, Von J.G. Tricina-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the rang from 1 to 100 KDa. *Anal Biochem* 1987; 166:368-379.
 24. Smith A.G, Hooper M.L. Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stemm cells. *Dev Biol* 1987; 121:1-9.
 25. Stojkovic M, Wolf E, Van Langendonck A, Vansteenbrugge A, Charpigny G, Reinaud P, Gandolfi F, Brevivi T, Mermillod P, Terqui M, Brem G, Massip A. Correlations between chemical parameters, mitogenic activity and embriotropic activity of bovine oviduct-conditioned medium. *Theriogenology*. 1997; 48:659-673.
 26. Trouson A. Current status of IVM/IVF and embryo culture in humans and farm animals. *Theriogenology*. 1994; 41:57-66.
 27. Van Inzen W.G. Van Stekelemburg-Hamers Weima S.M. Kruip T, Bevers M, Mummery C.L. Culture of bovine embryo to blastocyst stage using buffalo rat liver (BRL) cells. *Theriogenology*. 1994; 43:723-738.
 28. Vansteenbrugge A, Van Langendonck A, Seutnaire C. Massip A. Dessy F. In vitro development of bovine embryo in buffalo rat liver or bovine oviduct-conditioned medium. *Theriogenology*. 1994; 42:931-940.
 29. Vansteenbrugge A, Van Langendonck A, Donnay I, Massip A, Dessy F. Effect of high molecular weight factors present in bovine oviduct-conditioned medium on in vitro bovine embryo development. *Theriogenology*. 1996;46:631-641.
 30. Voelkel S.A. Hu Y.X. Effect Of Gas Atmosphere On The Development Of on-cell bovine embryos in two culture systems. *Theriogenology*. 1992; 37:1117-1131.
 31. Wegner C.C. Killian G.J. In vitro and in vivo association of anoviduct estrus-association protein with bovine pellucida. *Molec Reprod Dev* 1991; 29:77-84.
 32. Yadav R.B. King W.A. Betteridge K.J. Relationships between the completion of first cleavage and the chromosomal complement, sex, and development rates of bovine embryos generated in vitro. *Molec Repro Dev*. 1993; 36:434-439.