

Efecto del Método de Colección y Tensión de Oxígeno sobre el Desarrollo de Ovocitos Bovinos Fecundados y Cultivados *in vitro*

EFFECT OF RECOVERY METHOD AND OXYGEN TENSION ON DEVELOPMENT OF BOVINE OOCYTES FERTILIZED AND CULTURED *IN VITRO*

Lenin Benavides I.¹, Wilfredo Huanca L.^{1,2}, Lisbeth Quintanilla M.¹

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la influencia del método de colección y la tensión de oxígeno sobre los parámetros de la producción *in vitro* (PIV) de embriones. En el Experimento 1 se comparó el efecto de dos métodos de colección, aspiración y disección sobre la tasa de división y desarrollo embrionario. La tasa de división a las 72 horas posinseminación fue de 71.4 y 61.0% con el método de aspiración y de disección, respectivamente ($p < 0.05$), y sin diferencias significativas en la tasa de blastocistos al día 7 y 9 posfecundación. En el Experimento 2 se compararon dos tensiones de oxígeno en la etapa de cultivo, 5 y 20% de oxígeno, obteniéndose una tasa de división de 69.7 y 59.7% para el cultivo con 5 y 20% de O₂, respectivamente ($p < 0.05$) y un 29.8 y 19.3% de blastocistos al día 7 posfecundación bajo 5 y 20% de O₂, respectivamente ($p < 0.05$), pero sin diferencia estadística en la tasa de blastocistos al día 9 posfecundación. Los resultados sugieren que el método de aspiración y el cultivo con una tensión de oxígeno del 5% pueden ser considerados como factores adecuados para lograr las condiciones óptimas en el proceso de producción *in vitro* de embriones bovinos.

Palabras clave: embrión, oxígeno, colección, bovino, PIV

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of the recovery method and oxygen tension on *in vitro* embryo (IVP) production. In Experiment 1 the effect of two recovery methods, aspiration and dissection on embryo division and development rates was evaluated. The 72 hour post-insemination division rate was 71.4% with aspiration and 61.0% with dissection ($p < 0.05$), while no statistical difference was found on blastocyst

¹ Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

² E-mail: whuanca2002@yahoo.com

Recibido: 14 de diciembre de 2014

Aceptado para publicación: 4 de julio de 2015

rates 7 and 9 days post-insemination. In Experiment 2 two oxygen tensions, 5 and 20%, were compared in the culture stage obtaining higher division rate and 7-day blastocyst rate with 5% oxygen tension (69.7 and 29.8% respectively) compared with 20% oxygen tension (59.7 and 19.3% respectively). The results suggest that the aspiration recovery method and 5% oxygen tension must be considered to achieve optimal conditions for *in vitro* embryo production.

Key words: embryo, oxygen, collection, bovine, IVP

INTRODUCCIÓN

El mejoramiento de los sistemas de cultivo *in vitro* son importantes para la producción de embriones con alta capacidad de desarrollo (Hansen *et al.*, 2004). La producción *in vitro* de embriones implica la colección de ovocitos inmaduros mediante punción (Kane, 2003) o por disección de los folículos (Carolan *et al.*, 1994), maduración *in vitro*, fecundación *in vitro* y cultivo embrionario *in vitro* (Kane, 2003). Si bien existe controversia sobre las ventajas de la disección, esta puede ser importante para la colección de ovocitos inmaduros donde el Complejo Ovocito-Cumulus (COC) no está sobre un pedículo como ocurre con los ovocitos maduros, donde es más difícil desalojarlos desde las capas de granulosa (Fry *et al.*, 1996).

Existe evidencia que indica que la concentración de oxígeno influye en el desarrollo embrionario, aunque aún existen aspectos controversiales (Leese *et al.*, 1998). Cambios en la tensión de oxígeno observados en el oviducto y útero indican que un mecanismo sistémico es el responsable, en lugar de acciones locales de los embriones en crecimiento (Bavister *et al.*, 1983). La capacidad de desarrollo de embriones cultivados en medios modificados como el SOF a 5% de O₂ declina cuando son cultivados al 20%, señalándose que la producción de interferón es similar a la producida bajo condiciones *in vivo* (Gyu-Jin *et al.*, 2007).

Existen controversias respecto a si las bajas concentraciones de oxígeno son benéfi-

cas durante la maduración del ovocito (Harvey, 2007). Clark *et al.* (2006) proponen un modelo de disminución paulatina de la presión de oxígeno a medida que avanza la formación del embrión, en tanto que Harvey *et al.* (2002) plantean que los embriones humanos y bovinos podrían establecer una gradiente significativa que lleva a la anoxia en el centro del embrión.

A pesar de estas observaciones, los embriones de la mayoría de especies son cultivados en condiciones cercanas a la atmosférica (20% de oxígeno) o a 5% de oxígeno sin que lleguen a presentar los cambios dinámicos en la concentración de oxígeno que se observan *in vivo* (Harvey, 2007). Así, Oyadama y Fukui (2004) reportan mejores resultados con 20% de oxígeno durante la maduración *in vitro* en bovinos, mientras que otros autores (Nagao *et al.*, 1994; Hashimoto *et al.*, 2000; Van Soom *et al.*, 2002) demuestran que reduciendo la concentración de oxígeno a 5% se obtiene un mayor número de oocitos divididos que alcanzaron el estado de blastocisto y mayor número de células por blastocisto.

El efecto positivo de las bajas concentraciones de oxígeno es, además, evidente en lo que respecta al metabolismo embrionario. Se ha demostrado que incrementa la utilización de la glucosa y oxidación de piruvato en ratones, evidenciado por un incremento en la producción de CO₂ y lactato (Khurama y Wales, 1989; Hooper *et al.*, 2001). Asimismo, un reducido contenido de H₂O₂ en embriones porcinos cultivados bajo 5% de oxígeno está asociado con la reducción de la

fragmentación del ADN (Kitagawa *et al.*, 2004).

La adaptación a la hipoxia involucra un amplio rango de respuestas incluyendo expresión génica, funciones metabólicas alteradas y activación alterada de canales iónicos. La habilidad de responder a los cambios de la tensión de oxígeno dentro de un rango fisiológico depende de la activación de una familia de factores de transcripción conocida como factores inducibles por hipoxia (HIF) (Semenza, 2000). Los HIF son considerados como importantes reguladores del desarrollo embrionario en un ambiente *in vivo*, de modo que su activación podría ser importante para la adaptación de embriones *in vitro* a un ambiente reducido en oxígeno similar al encontrado naturalmente (Harvey, 2007).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del método de colección de ovocitos (aspiración o disección folicular) y la tensión de oxígeno (5 y 20%) sobre el desarrollo embrionario en ovocitos bovinos cultivados *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Estudio

Los experimentos se realizaron en la sección de Biotecnología Reproductiva del Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Colección y Procesamiento de Muestras

Se colectaron ovarios de animales beneficiados en un camal de la ciudad de Lima, ubicado a 2.7 km del laboratorio, sin considerar el estado reproductivo del animal. Los ovarios fueron colocados y transportados en un termo conteniendo solución salina 0.9%

suplementada con antibiótico antimicótico (A5955, Sigma), y mantenido a una temperatura inicial de 37 °C.

Se seleccionaron los ovocitos que presentaron citoplasma homogéneo y finamente granulado, el cual debía llenar por completo el espacio delimitado por la zona pelúcida; además, debían estar cubiertos por múltiples y uniformes capas compactas de células del cúmulo (Bertoldo *et al.*, 2010).

Los ovocitos fueron colectados mediante aspiración o disección, madurados en medio TCM-199 (Sigma M2520), suplementado con PVP (Polivinilpirrolidone) (Sigma P0930), 100 mM piruvato sódico, 5 mg/ml gentamicina (Sigma G1264), 20 mg/ml de FSH (hormona foliculo estimulante), 10 µg/ml hCG y 1 mg/ml de estradiol (Sigma E2758), por 24 h a una temperatura de 39 °C, 5% de CO₂, 20 o 5% de O₂ y máxima humedad relativa.

Al término de las 24 h en maduración, los ovocitos fueron trasladados a un medio de fecundación. Para ello, fueron lavados tres veces en medio TL-Hepes de pre-fecundación suplementado con 3 mg/ml de BSA (albúmina sérica bovina), 100 mM de piruvato y 5 mg/ml de gentamicina y posteriormente transferidos a gotas de 40 µl de medio de fecundación TL-Stock suplementado con 6 mg/ml de BSA, 100 mM de piruvato y 5 mg/ml de gentamicina. La fecundación *in vitro* se realizó con semen comercial congelado en pajillas.

Al finalizar el periodo de fecundación, los presuntos cigotos fueron retirados de las gotas de fecundación e introducidos en gotas de 30 µl de medio de cultivo KSOM-AA (Potassium Simplex Optimized Medium). La proporción de cigotos que se dividieron fue evaluada a las 72 h posfecundación y luego fueron trasladados al medio de cultivo SOF (Synthetic Oviduct Fluid). En los días 7 a 9 posfecundación se observaron los estadios de blastocisto y blastocisto expandido.

Diseño Experimental

Experimento 1: Evaluación de la técnica de obtención de ovocitos

Tuvo por objetivo comparar dos técnicas de colección de ovocitos (aspiración manual y disección) sobre la tasa de división y la tasa de desarrollo embrionario hasta los estadios de blastocisto y blastocisto expandido en los días 7 y 9 posfecundación, respectivamente.

Experimento 2: Evaluación de la tensión de oxígeno en el cultivo embrionario

Tuvo por objetivo comparar el efecto de dos tensiones de oxígeno (5 y 20%) sobre la tasa de división posfecundación y la tasa de desarrollo embrionario hasta los estadios de blastocisto y blastocisto expandido en los días 7 y 9 posfecundación, respectivamente.

Análisis Estadístico

Los resultados fueron expresados como porcentajes. Los datos del experimento 1 se analizaron con la prueba de «t» de student para muestras independientes de diferentes varianzas (aproximación de Welch). Asimismo, para determinar diferencias en cantidades de ovocitos sometidos a cultivo según su calidad (experimento 1), así como por porcentajes de blastocistos obtenidos (experimentos 1 y 2) se realizó la prueba de Chi cuadrado de Pearson. Todos los resultados se expresaron con un nivel de significancia de 95% ($p < 0.05$). Se utilizó el programa estadístico STATA 10.0 (Stata Corp.).

RESULTADOS

En el Experimento 1 se utilizaron 116 ovarios para la técnica de aspiración y 88 ovarios para la técnica de disección. Se recuperaron 772 ovocitos con el método de aspiración y 1134 con el método de disección, pero luego del proceso de selección, se utili-

zaron 451 y 449 ovocitos, procedentes de aspiración y disección, respectivamente. Los ovocitos fueron categorizados de acuerdo a su calidad como A (excelente), B (buena) y C (mediana), según Bertoldo *et al.* (2010).

Los resultados muestran una diferencia en el número de ovocitos recuperados por ovario ($p < 0.05$), a favor del método de disección (Cuadro 1). Además, hubo diferencia significativa en el porcentaje de ovocitos divididos a las 72 horas de la fecundación a favor del método de aspiración ($p < 0.05$), pero no se registraron diferencias entre ambos métodos de colección en el porcentaje de blastocistos ni en el porcentaje de blastocistos expandidos (Cuadro 1). Por otro lado, no hubo diferencias significativas entre categorías de ovocitos según el método de colección (Cuadro 2).

Los resultados del Experimento 2 muestran que existe diferencia entre la proporción de cigotos divididos y en la proporción de blastocistos al día 7 posfecundación por efecto de la tensión de oxígeno ($p < 0.05$, Cuadro 3); sin embargo, estas diferencias desaparecen en el día 9 posfecundación.

DISCUSIÓN

El método de disección mostró una ventaja inicial sobre el método de aspiración manual al presentar una media de ovocitos recuperados por ovario significativamente mayor; sin embargo, no hubo diferencias significativas en el número de ovocitos aptos para cultivo *in vitro* y, más aún, la proporción de ovocitos divididos luego de la fecundación fue estadísticamente superior en el grupo de aspiración manual ($p < 0.05$).

Este resultado podría estar relacionado al hecho de que los ovocitos obtenidos por aspiración sufren menos estrés de manejo por parte del operario, requieren de menos tiempo y permiten mejores condiciones de limpieza (Arav, 2000). Además, con el método de

Cuadro 1. Resultados del uso de dos métodos de obtención de ovocitos de bovino en el cultivo de embriones *in vitro*¹

Método de colección	N.º de ovocitos por ovario	Divisiones a las 72 hpi (%) ²	Blastocistos a los 7 dpi (%) ³	Blastocistos expandidos a los 9 dpi (%)
Aspiración	7.4 ± 4.7 ^a	71.4 ± 6.5 ^a	17.6 ± 3.7 ^a	11.4 ± 1.9 ^a
Disección	14.5 ± 4.4 ^b	61.0 ± 8.6 ^b	22.9 ± 9.3 ^a	12.1 ± 3.9 ^a

^{a,b} Superíndices diferentes dentro de columnas indican diferencia entre tratamientos (p<0.05)

¹ Número de réplicas = 5

² hpi: horas posinseminación

³ dpi: días posinseminación

Cuadro 2. Número de ovocitos de bovino según calidad obtenidos por aspiración o disección sometidos a cultivo *in vitro*¹

Método de colección	Calidad del Ovocito ²			
	A	B	C	Total
Aspiración	79	286	86	451
Disección	83	253	113	449

¹ Número de réplicas = 5

² No se observó diferencia estadística entre grupos según la calidad del ovocito

Cuadro 3. Resultados del uso de dos tensiones de oxígeno en el cultivo de embriones *in vitro*

Tensión de oxígeno	Ovocitos en cultivo (n)	Divisiones a las 72 hpi (%)	Blastocistos a los 7 dpi (%)	Blastocistos expandidos a los 9 dpi (%)
5%	252	69.7 ± 0.1 ^a	29.8 ± 0.01 ^a	14.5 ± 0.05 ^a
20%	264	59.7 ± 0.1 ^b	19.3 ± 0.03 ^b	9.8 ± 0.02 ^a

^{a,b} Superíndices diferentes dentro de columnas indican diferencia entre tratamientos (p<0.05)

¹ Número de réplicas = 4

disección, la búsqueda de los ovocitos aptos se dificulta debido a la mayor cantidad de detritus en el medio. Asimismo, el número de ovocitos descartados que fueron obtenidos por el método de disección fue mucho mayor, ya que la disección implica un manipuleo más

rudo y prolongado y en este trámite los ovocitos pueden perder o alterar sus capas de células del cumulus; además, al diseccionar la corteza ovárica se estarían recuperando también ovocitos más inmaduros cuyo antro aún no es visible y no estarían en condiciones

de someterse a un proceso de cultivo *in vitro* (Arlotto *et al.*, 1990).

Los resultados del Experimento 2 mostraron un mejor comportamiento de los ovocitos fecundados y mantenidos bajo condiciones de baja tensión de oxígeno, corroborando otros estudios donde se comparó la eficiencia del 5 y el 20% de O₂ en términos de formación de blastocistos en bovinos (Lim *et al.*, 1999) y embriones humanos (Dumoulin *et al.*, 1999). Otro hallazgo interesante es que los embriones cultivados bajo 5% de O₂ mostraron mayor porcentaje de embriones divididos, indicando que podría llegar a tener un incremento de la producción total de blastocistos. Hay que considerar que durante el desarrollo *in vivo*, los embriones mamíferos están sujetos a una tensión de 9% de O₂ en el oviducto, seguido de una tensión de 2% hacia el día tres de la ovulación (Fischer y Bavister, 1993).

El número de blastocistos obtenidos no sería el único parámetro diferencial entre las tensiones de oxígeno, pues es posible que la calidad de embriones cultivados bajo 20% de O₂ sea inferior a aquellos obtenidos bajo 5% de O₂. El estadio de divisiones en embriones bovinos puede estar sujeto a proteínas derivadas maternalmente para su primera división en la etapa de divisiones, pero entonces la transición zigótico-maternal debe ocurrir y la expresión génica debería ser activada en los embriones (Memili y First, 2000). Aún debe determinarse si esta transición o la activación que prosigue de la expresión génica del embrión se afectan por una alta tensión de oxígeno. En cualquier caso, ha sido reportado que los embriones vecinos en una gota de cultivo pueden influenciar en la cantidad de oxígeno disponible (Trimarchi *et al.*, 2000), lo cual podría ser la razón para un mejor desarrollo de embriones cultivados en grupos versus embriones solitarios (Yuan *et al.*, 2000).

Se ha propuesto que el efecto beneficioso de un co-cultivo con células somáticas sobre el desarrollo embrionario podría ser

causado por las bajas tensiones de oxígeno en la vecindad del embrión (Bavister, 1988). Los mecanismos de acción no han sido esclarecidos pero se postula que la tensión de oxígeno interviene en la regulación de la proliferación celular y la diferenciación durante los estadios tempranos del desarrollo embrionario. Aunque las tensiones de oxígeno durante el tránsito oviductual son del 9% (Fischer y Bavister, 1993), esto es mucho más bajo que el 20% de O₂ presente en condiciones atmosféricas.

Las condiciones atmosféricas de oxígeno podrían dañar el desarrollo embrionario mediante el incremento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la célula (Parchment, 1993). Los niveles de ROS están elevados en embriones cultivados bajo 20% de O₂ (Adachi *et al.*, 2001) y están probablemente implicados en el crecimiento retardado de los embriones *in vitro* (Tarin, 1996). Además, se ha reportado que la tasa de células apoptóticas aumenta significativamente en embriones cultivados bajo 20% de O₂ (Van Soom *et al.*, 2002). Por otro lado, la influencia del oxígeno sobre los factores inducibles por hipoxia (Semenza, 2000) parece brindar una explicación más veraz sobre el rol que tiene la tensión de oxígeno en el desarrollo embrionario. Asimismo, se reporta que embriones en estado de blastocisto consumen más oxígeno que aquellos de etapas más tempranas (Hooper *et al.*, 2001).

CONCLUSIONES

- El número de ovocitos recuperados por ovario es significativamente mayor cuando se usa el método de disección ovárica (14.4 ± 4.4) comparado con la recuperación por aspiración manual (7.4 ± 4.7).
- La cantidad de ovocitos cultivables fue equivalente para ambos métodos de colección, pese a haberse obtenido mayor número de ovocitos por ovario con el método de disección.

- El método de colección de ovocitos no influyó en el porcentaje de blastocistos obtenidos.
- El porcentaje de cigotos divididos al día tres posfecundación fue significativamente mayor bajo una tensión de 5% de O₂ (69.7%) que el obtenido a 20% de O₂ (59.7%).
- El porcentaje de blastocistos al día siete posfecundación obtenidos con una tensión de 5% de O₂ fue significativamente mayor (27.8%) que el obtenido a 20% de O₂ (19.3%).

LITERATURA CITADA

1. **Adachi S, Ito H, Tamamori-Adachi M, Ono Y, Nazato T, Abe S. 2001.** Cyclin A/cdk2 activation is involved in hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Circ Res* 88: 408-414.
2. **Arav A. 2000.** Transillumination increases oocyte recovery from ovaries collected at slaughter. A new technique report. *Theriogenology* 55: 1561-1565.
3. **Arlotto T, Leibfried-Rutledge M, First N. 1990.** Size distribution and meiotic competence of bovine primary oocytes from two locations in the ovary. *Theriogenology* 33: 188 (Abstr).
4. **Bavister B, Liebfried M, Lieberman G. 1983.** Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biol Reprod* 28: 235-247.
5. **Bavister BD. 1988.** Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* or *in vitro*. *Theriogenology* 29: 143-154.
6. **Bertoldo M, Holvoake P, Evans G, Grupen C. 2010.** Oocyte development competence is reduced in sows during the seasonal infertility period. *Reprod Fertil Dev* 22: 1222-1229. doi: 10.1071/RD10093
7. **Booth P, Holm P, Callesen H. 2005.** The effect of oxygen tension on porcine embryonic development is dependent on embryo type. *Theriogenology* 63: 2040-2052.
8. **Carolan C, Monaghan P, Gallagher M, Gordon I. 1994.** Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Theriogenology* 41: 1061-1068.
9. **Clark A, Stokes Y, Lane M, Thompson J. 2006.** Mathematical modelling of oxygen concentration in bovine and murine cumulus-oocyte complexes. *Reproduction* 131: 999-1006.
10. **Dumoulin JC, Meijers CJ, Bras M, Coonen E, Geraedts JP, Evers JL. 1999.** Effect of oxygen concentration on human *in vitro* fertilization and embryo culture. *Hum Reprod* 14: 465-469.
11. **Fischer B, Bavister B. 1993.** Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fert* 99: 673-679.
12. **Fry R, Niall E, Simpson T, Squires T, Reynolds J. 1996.** The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology* 47: 977-987.
13. **Gott AL, Hardy R, Winston R, Léese H. 1990.** Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 5: 104-108.
14. **Harvey A, Kind K, Thompson J. 2002.** REDOX regulation of early embryo development. *Reproduction* 123: 479-486.
15. **Harvey A. 2007.** The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Anim Reprod Sci* 98: 113-128.
16. **Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Yamada M, Imai H, Kashima N. 2000.** Low oxygen tension during *in vitro* maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. *Mol Reprod Dev* 57: 353-360.
17. **Hooper K, Lane M, Gardner D. 2001.** Reduced oxygen concentration increases mouse embryo development and oxidative metabolism. *Theriogenology* 55: 334 (Abstr).

18. **Kane M. 2003.** A review of *in vitro* gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. *Anim Reprod Sci* 79: 171-190.
19. **Khurana N, Wales R. 1989.** Effects of oxygen concentration on the metabolism of [U-14C] glucose by mouse morulae and early blastocysts *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 1: 99-106.
20. **Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T. 2004.** Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* 62: 1186-1197.
21. **Legge M, Sellens M. 1991.** Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. *Hum Reprod* 6: 867-871.
22. **Lim JM, Mei Y, Chen B, Godke RA, Hansel W. 1999.** Development of bovine IVF oocytes cultured in medium supplemented with a nitric oxide scavenger or inhibitor in a co-culture system. *Theriogenology* 51: 941-949.
23. **McKiernan S, Bavister B. 1990.** Environmental variables influencing *in vitro* development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage. *Biol Reprod* 43: 404-413.
24. **Memili E, First NL. 2000.** Zygotic and embryonic gene expression in the cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote* 8: 87-96.
25. **Nagao Y, Saeki K, Hoshi H, Kainuma H. 1994.** Effects of oxygen concentration and oviductal epithelial tissue on the development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes cultured in protein-free medium. *Theriogenology* 41: 681-687.
26. **Oyamada T, Fukui Y. 2004.** Oxygen tension and medium supplements for *in vitro* maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *J Reprod Dev* 50: 107-117.
27. **Parchment RE. 1993.** The implications of a unified theory of programmed cell death, polyamines, oxyradicals and histogenesis in the embryo. *Int J Dev Biol* 37: 75-83.
28. **Semenza G. 2000.** Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol* 59: 47-53.
29. **Tarin JJ. 1996.** Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos. *Mol Hum Reprod* 2: 717-724.
30. **Thompson J, Simpson A, Pugh P, Donnelley P, Tervit H. 1990.** Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J Reprod Fertil* 89: 573-578.
31. **Trimarchi JR, Liu L, Porterfield DM, Smith PJS, Keefe D. 2000.** Oxidative phosphorylation-dependent and independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 62: 1866-1874.
32. **Van Soom A, Yuan Y, Peelman L, de Matos D, Dewulf J, Laevens H, de Kruif A. 2002.** Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. *Theriogenology* 57: 1453-1465.
33. **Yuan YQ, Van Soom A, Laevens H, Coopman F, Peelman LJ, de Kruif A. 2000.** Single embryo culture affects hatching rate in bovine *in vitro*-produced embryos. *Theriogenology* 53: 307 (Abstr).