

ESTATUS FISIOLÓGICO DE LA HEMBRA BOVINA Y SU RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES

Adriana Fernández Pinto, Mg. Sc.

Los objetivos de la producción de embriones *in vitro* han sido muy variados; desde los estudios puntuales para el esclarecimiento de los fenómenos fisiológicos y para alcanzar un incremento en los distintos aspectos de la producción animal hasta la multiplicación y conservación de especies en peligro de extinción.

La producción de embriones *in vitro* (PIV) es una valiosa herramienta para obtener animales de alto valor genético; sin embargo, un gran número de hembras donadoras son infértiles o no responden eficientemente a la terapia convencional, como por ejemplo, los programas de ovulación múltiple. Por otra parte, la técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonido (OPU, por sus siglas en inglés, *ovum pick up*), no requiere que la hembra bovina presente un ciclo reproductivo normal; al ser utilizada en conjunto con la PIV, incrementa considerablemente la posibilidad de acortar el intervalo generacional y de favorecer la ganancia genética debido a la mayor oportunidad de producir un mayor número de descendientes por año que la obtenida utilizando métodos reproductivos convencionales (Ward *et al.*, 2000).

Existen diferencias en el origen de los ovarios utilizados para la PIV atribuibles al estatus reproductivo de la donadora, raza, etc., como también en el procedimiento de recolección de los ovocitos, selección de los ovocitos y de los embriones, así como en la calidad del semen del toro utilizado. Para la producción de embriones *in vitro*, comúnmente se utiliza una alta población heterogénea de ovocitos obtenidos de

hembras bovinas postmortem. Sin embargo, es posible incrementar la obtención de blastocistos a través de la selección de ovocitos con un mayor potencial de desarrollo. Asimismo, la calidad del ovocito está determinada por el grado de expansión y por el número de capas de células del cúmulo que rodean al ovocito, así como, por la apariencia del citoplasma del mismo (Bilodeau-Goeseels & Panich, 2002). Solo entre 30-40% de los ovocitos bovinos se desarrollan a la etapa de blastocisto después de la maduración, fecundación y cultivo de embriones *in vitro* (Merton *et al.*, 2003).

Las evidencias sugieren que la calidad intrínseca del ovocito es el factor determinante de la proporción de ovocitos que se desarrollarán hasta la etapa de blastocisto. La maduración del ovocito es un proceso complicado, por lo cual la selección del ovocito para el cultivo *in vitro* solamente por su morfología, no es suficiente para obtener una mayor producción de embriones *in vitro* (Blanco *et al.*, 2011). Por otra parte, el crecimiento folicular y la dominancia que precede al proceso de ovulación es crítico para el potencial desarrollo del ovocito bovino (Chaubal *et al.*, 2007), ya que a través del desarrollo folicular se adquiere la competencia del ovocito.

Producción, recuperación y selección de ovocitos

La producción de un mayor número de ovocitos de progenie de alto valor genético meritorio se ve incrementada por la utilización de procedimientos tales como la recuperación de ovocitos de hembras prepúberes, así como de hembras gestantes, con la finalidad de intensificar la presión de selección y de acortar el intervalo generacional, lo que resulta en altas tasas de mejoramiento genético (Merton *et al.*, 2003).

Con la finalidad de mejorar la eficiencia en la producción de embriones bovinos *in vitro*, es necesario recuperar un gran número de ovocitos que tengan la capacidad para continuar su desarrollo y maduración. Los ovarios obtenidos de vacas de matadero constituyen una fuente económica de ovocitos con fines comerciales y de investigación, pero la variabilidad de su calidad es muy alta. Los ovocitos recuperados de hembras de matadero son extremadamente heterogéneos en términos de calidad y competencia de desarrollo. Por lo tanto, la selección de los ovocitos según el estatus reproductivo de la hembra bovina es un parámetro vital a considerar para mejorar las tasas de desarrollo de embriones *in vitro*, aunque también existen grandes diferencias en el desarrollo de competencia de los ovocitos que maduran *in vivo*, con respecto a la de aquellos madurados en condiciones *in vitro*.

Otra área de especial interés en este campo, además de la producción de embriones bovinos *in vitro*, es la recuperación de ovocitos mediante aspiración a nivel de los folículos ováricos de una hembra viva, a través del apoyo de la observación en tiempo real a través de la utilización de la ecografía de ultrasonido. El valor comercial de esta metodología junto con la fecundación *in vitro* (FIV) permite producir un alto número de embriones de las vacas de más alto valor genético, así como también obtener embriones de vacas viejas de elevado nivel productivo las cuales presentan desórdenes reproductivos tales como adherencias, problemas a nivel de los oviductos, al igual que en vacas con gestaciones tempranas, hembras que no responden a los sistemas de ovulaciones múltiples o sencillamente, que no son capaces de quedar gestantes (Van Wagtendonk-deLeeuw, 2006).

La población de ovocitos aspirados por OPU, es más homogénea que en la TE y en la FIV utilizando ovocitos obtenidos de matadero, debido a que la repetición de

aspiraciones, elimina los folículos atrésicos y dominantes. La PIV utilizando ovarios de hembras de matadero, proporciona ovocitos recuperados de folículos en cualquier fase de desarrollo y de cualquier tamaño visible de la superficie ovárica. Por el contrario, los ovocitos obtenidos por OPU, se obtienen de folículos no dominantes que no han alcanzado su desarrollo preovulatorio final, por lo que la maduración debe realizarse en condiciones *in vitro* (Merton *et al.*, 2003).

Calidad de los ovocitos recuperados

Uno de los factores claves en la PIV de embriones bovinos, es la variabilidad en la calidad de los ovocitos utilizados. La influencia de la calidad del ovocito sobre el desarrollo potencial del embrión, está reportada en la hembra bovina, más que en cualquier otra especie (Sirard *et al.*, 2006).

Cuando los embriones bovinos son producidos utilizando la maduración y fecundación *in vitro*, la proporción de embriones que se desarrolla hasta la etapa de blastocisto, depende de las condiciones de cultivo y el potencial desarrollo de los ovocitos. Las características definitivas que permiten que el complejo *cumulus* ovocito (COCs) adquiera su completa competencia una vez fecundado y se convierta en un embrión viable, son desconocidas (Bilodeau-Goeseels & Panich, 2002).

Sin embargo, existen estudios (Pavlok *et al.*, 1992; Blondin & Sirard, 1995), que han reportado varios parámetros para determinar la calidad, entre los que se incluyen: el diámetro del folículo, tamaño del ovocito y nivel de atresia de los folículos y ovocitos. Los COCs obtenidos de folículos grandes y medianos, tienen mayor competencia de desarrollo, que aquellos ovocitos provenientes de folículos pequeños. Por el contrario, la mayoría de los COCs colectados, de folículos entre 2 a 6 mm de diámetro, parecen

madurar en condiciones *in vitro*, pero muchos de ellos no son capaces de producir blastocistos (Brackett y Zuelke, 1993).

Evaluación morfológica de los ovocitos

De Loos y colaboradores (1989), reportaron una clasificación para la evaluación morfológica de los COCs, siendo agrupados en cuatro categorías: i) Grado I: ovocitos con citoplasma homogéneo rodeado de 2 a 4 capas compactas de células del cúmulo; ii) Grado II: ovocitos con presencia de citoplasma homogéneo o con algún grado de heterogeneidad y rodeado de 5 ó más capas compactas de células del cúmulo; iii) Grado III: ovocitos con citoplasma heterogéneo y/o rodeado con capas de células del cúmulo, incompletas o con menos de 5 capas y iv) Grado IV: ovocitos con presencia de citoplasma fuertemente heterogéneo, con ausencia parcial o total de células del cúmulo ó presencia de células del cúmulo expandidas.

La competencia de desarrollo de un ovocito, se expresa por su capacidad de soportar los eventos del desarrollo temprano, tales como la extrusión correcta de los gránulos corticales una vez que se produce la fertilización, descondensación de la cabeza del espermatozoide y división y activación del genoma embrionario. En el caso del embrión bovino, la transcripción de su genoma comienza en la etapa de 8 a 16 células (Frei *et al.*, 1989).

Esta competencia de desarrollo del ovocito, ha sido estudiada en relación al diámetro folicular en vacas (Tan y Lu, 1990; Pavlok, *et al.*, 1992). En los actuales momentos, los diferentes métodos para la producción de embriones bovinos *in vitro*, utilizan el diámetro folicular como criterio principal para la selección de los COCs; sin embargo, folículos del mismo diámetro, pueden estar en fases fisiológicas completamente distintas, dependiendo de la etapa de desarrollo de la onda folicular para

el momento de la colección (Vassena *et al.*, 2003). Por otra parte, hay evidencias que comprueban que esta competencia de desarrollo del ovocito, es adquirida mientras están aún dentro del folículo.

Crecimiento y maduración de los ovocitos

El desarrollo de tecnologías para el crecimiento y maduración de ovocitos, a partir del gran número de folículos primordiales existentes en los ovarios, es de gran importancia en el campo de la reproducción asistida tanto en humanos, como en las tecnologías de producción animal (Picton *et al.*, 2008).

En la hembra bovina, normalmente se selecciona un solo folículo que ovulará cuando exista el ambiente endocrino adecuado. Por el contrario, cuando se implementa la PIV, se utilizan ovocitos de folículos en diferentes fases de la onda folicular. Por supuesto, lo heterogéneo de estos ovocitos, puede conducir a la producción de embriones no óptimos comparados a los que pueden derivarse en condiciones *in vivo* o naturales (Merton *et al.*, 2003). Para un mejor entendimiento de lo antes expresado, es necesario describir brevemente como es la dinámica folicular en bovinos. La dinámica folicular puede definirse como el proceso continuo de crecimiento y regresión de folículos antrales, que conlleva al desarrollo del folículo pre-ovulatorio (Lucy *et al.*, 1992). Durante el ciclo estral de la hembra bovina, se pueden presentar una, dos, tres y hasta cuatro ondas de crecimiento folicular, lo cual va a depender de los niveles de progesterona (P₄) durante la fase luteal (Díaz, 1999).

En la actualidad, se conoce que una onda de crecimiento folicular en animales domésticos, está compuesta de cuatro fases: reclutamiento, selección, desviación y dominancia (Ginther *et al.*, 1996). Cada onda folicular se caracteriza por la emergencia simultánea (fase de reclutamiento) de un grupo de 8 a 41 folículos (Adams *et al.*, 2008)

de 5 a 7 mm de diámetro. Cada una de las ondas es precedida por un incremento en la concentración de FSH, la cual inicia el crecimiento de un grupo de folículos FSH-dependientes de ≥ 3 mm de diámetro. Luego de la emergencia de este grupo de folículos, uno de estos folículos debe ser seleccionado (fase de selección) y convertirse en el folículo dominante, mientras los otros folículos se hacen atrésicos y sufren regresión (Díaz, 2008).

El folículo seleccionado se convertirá en folículo dominante, proceso mediante el cual, el folículo produce mayores niveles de estradiol (E_2), promueve su propio desarrollo y aumenta su diámetro, comparado con los compañeros de su cohorte (fase de desviación) y además, adquiere competencia para alcanzar la última fase de la onda (fase de dominancia), inhibiendo el desarrollo de los compañeros de su cohorte y la emergencia de la próxima onda. El folículo seleccionado es aquel que adquiere, primero que el resto, un número mayor de receptores para la hormona luteinizante (LH) en las células de la granulosa (Díaz, 2008).

La fase de desviación, en la onda de crecimiento folicular ocurre cuando se inicia la diferencia en el crecimiento de los dos folículos más grandes de una cohorte (Ginther *et al.*, 1997). Es a partir de este momento, que el folículo dominante y el primer folículo subordinado, divergen gradualmente en diámetro.

La fase de dominancia se sucede cuando el folículo ovárico alcanza un diámetro aproximado de 10 mm, lo cual es señal que ese folículo escapó a la atresia y secreta productos como inhibina y $E_2-17\beta$, capaces de inhibir el reclutamiento de una nueva onda folicular y el crecimiento de los folículos de su cohorte. Cuando el folículo dominante encuentra el ambiente hormonal adecuado (bajos niveles de P_4), es capaz de ovular y como consecuencia se formará el cuerpo lúteo. En caso contrario, cuando el

folículo dominante llega a la fase de dominancia durante la fase luteal, en la cual existen altos niveles de P₄, y los niveles de LH no son suficientes para promover su crecimiento final y ovulación, este folículo dominante pierde su dominancia, va hacia la atresia permitiendo el reclutamiento y la emergencia de una nueva cohorte de folículos, del cual saldrá el próximo folículo dominante (Díaz, 2008).

En ese orden de ideas, se ha establecido que cada folículo grande (≥ 10 mm) contiene un ovocito capaz de desarrollarse hasta la fase de blastocisto, a diferencia de los folículos pequeños (Machatkova *et al.*, 2004). En el estudio realizado por estos autores, la tasa de desarrollo de los ovocitos colectados de folículos pequeños y medianos fue significativamente menor comparada con la de aquellos ovocitos recuperados de folículos grandes (19,1 y 35% *versus* 52,8%, respectivamente).

El día 5 después de la emergencia de la onda folicular, parece ser el momento más adecuado para la obtención de los ovocitos para la producción *in vitro* de embriones, en bovinos. Este momento se corresponde a la fase de desarrollo durante la cual la mayoría de folículos subordinados se encuentran en la fase estática o de atresia temprana (Adams, 1999). Estos estudios confirman resultados previos (Salomone *et al.*, 1999), quienes obtuvieron una alta tasa de blastocistos expandidos provenientes de ovocitos recuperados durante las fases estática y de regresión de la onda folicular, comparados con aquellos ovocitos colectados de folículos durante la fase de crecimiento de la onda folicular.

Relación entre momento de recuperación de ovocitos y competencia

En este sentido, existe una relación positiva entre atresia folicular y competencia del ovocito (Vassena *et al.*, 2003). Una mayor proporción de COCs recolectados de folículos subordinados durante la fase de regresión temprana mostró una mayor

evidencia de maduración nuclear, que aquellos ovocitos recolectados durante la fase estática y de crecimiento. Además, de los ovocitos obtenidos de folículos en regresión temprana (día 5 de la onda folicular), se desarrollaron más embriones *in vitro*, que aquellos obtenidos durante la fase de crecimiento (día 2), fase estática (día 3) ó fase de regresión tardía (día 7; Adams *et al.*, 2008).

Resultados de estos estudios, son también consistentes con investigaciones en las cuales un alto porcentaje de blastocistos fue obtenido cuando los ovarios recolectados de vacas postmortem, fueron mantenidos en solución salina a 30°C durante 4 h antes de obtener los COCs, corroborando la teoría que los efectos de la atresia folicular temprana, es beneficiosa para el desarrollo de la competencia del ovocito, pero las razones de este fenómeno, permanecen aún desconocidos (Vassena *et al.*, 2003).

Los ovocitos con la más alta competencia de desarrollo, en condiciones *in vitro*, son aquellos que presentan un citoplasma finamente granuloso, homogéneo y rodeados de por lo menos tres capas de células del cúmulo (Vassena *et al.*, 2003), sin embargo, el porcentaje de COCs saludables no cambia su morfología en ciertos momentos durante la onda de crecimiento folicular. Por el contrario, el porcentaje de ovocitos desnudos disminuye desde el día 3 al día 5 y 7 de la onda, mientras el porcentaje de COCs degenerados se incrementa durante esos mismos días (3 al 7 de la onda folicular).

Por otra parte, Chohan y Hunter (2003), señalan que los ovocitos recuperados durante la fase de metaestro del ciclo estral en hembras vacías, resultaron en una tasa de división embrionaria mayor (60%) que aquellos ovocitos recuperados durante la fase folicular (51,7%); mientras que los ovocitos obtenidos durante el diestro, presentaron una pobre tasa de fecundación así como de división embrionaria (39,8%), posiblemente

debido a la recuperación de ovocitos de una cohorte de folículos pequeños atrésicos provenientes de la primera o segunda onda de crecimiento folicular.

Es importante mencionar que durante el metaestro y diestro (fase luteal), predomina la secreción de P_4 por el CL, mientras que durante la fase folicular se caracteriza por el desarrollo de un folículo preovulatorio que secreta $E_2-17\beta$. Los mejores resultados obtenidos durante la fase luteal temprana, pueden deberse a ovocitos recuperados durante la primera onda de crecimiento folicular, después de la ovulación, debido a que durante esta etapa se va a recuperar un mayor número de ovocitos con competencia de desarrollo, que los recuperados durante otras fases del ciclo estral, como lo señalan Chohan y Hunter (2003). Por otra parte, el desarrollo del folículo dominante de la primera onda de crecimiento folicular, está asociado con la atresia de los folículos subordinados de esa misma cohorte, siendo los ovocitos de estos folículos los que han presentado mejor tasa de división embrionaria (Adams, 1999; Salomone *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2009).

Igualmente, Chohan y Hunter (2003), reportan que el desarrollo de los ovocitos recolectados de hembras gestantes y en anestro, es pobre (46,9% y 44,1%, respectivamente); sin embargo, dichos ovocitos, deben considerarse para la PIV. En este sentido, Behboodi *et al.* (1992) reportaron una tasa de división embrionaria de 38% de ovocitos recuperados de ovarios de hembras gestantes comparado con un 40% de ovocitos de hembras no gestantes y una tasa de blastocistos de 13% en ambos casos, indicando que las vacas gestantes durante el primer trimestre, son igualmente aceptables como donadoras de ovocitos para la PIV.

Por el contrario, Sivakumaran *et al.* (1991), señalaron una mayor tasa de división embrionaria (72%) para ovocitos provenientes de ovarios de vacas gestantes,

comparados con ovocitos provenientes de ovarios de vacas en diestro (69%). Se ha reportado (Moreno *et al.*, 1993) que los ovarios de vacas gestantes son una fuente de ovocitos con gran competencia de desarrollo. Esto puede ser debido a los altos niveles de P₄ en la circulación, resultando en la regresión del folículo dominante y la emergencia de ondas foliculares.

En otro estudio (Boediondo *et al.*, 1995), compararon la tasa de división embrionaria de ovocitos provenientes de ovarios de vacas vacías en ausencia y presencia de CL, resultando significativamente mayor en ausencia del CL (88% vs 75%, respectivamente). En el 2010, Pirestrani y colaboradores, no encontraron diferencias significativas en la tasa de división embrionaria de ovocitos provenientes de ovarios de vacas vacías sin CL (68,4%) y con CL (73,9%), infiriendo una tendencia mayor hacia los ovarios con CL. De igual forma, estos autores reportan la tasa de producción de blastocistos alcanzada, no encontrando diferencias significativas entre ambos grupos, señalando una leve tendencia a ser mayor en los ovocitos provenientes de ovarios con presencia de CL. En este sentido, indican que a pesar de los efectos menores observados durante la división embrionaria en cultivo, el estatus cíclico del ovario tiene efecto sobre la capacidad de los ovocitos de continuar su desarrollo hacia la etapa de blastocisto.

Las hembras cebú (*Bos indicus*) predominan en los países tropicales y regiones sub tropicales del mundo. Se han descrito diferencias importantes en los parámetros reproductivos entre las razas de animales *Bos indicus* y *Bos taurus* (Ventromila *et al.*, 1995; Figueiredo *et al.*, 1997); sin embargo, existe poca información en lo que respecta a la cantidad y tipos de ovocitos recuperados para la producción de embriones *in vitro*.

CONCLUSIÓN

Se justifica el inicio de investigaciones relacionando el estatus ovárico con la producción de embriones *in vitro*, en nuestro país, para generar conocimiento más profundo que permita seleccionar los ovocitos con mayor habilidad para desarrollarse a la etapa de blastocistos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams GP. 1999. Comparative pattern of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod Fertil* (54):17-32.

Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* (69):72-80.

Behboodi E, Anderson GB, BonDurant R. 1992. Development of *in vitro* fertilized oocytes from pregnant and non pregnant cows in oviductal epithelial and cumulus cell co-culture systems. *Theriogenology* (38):1077-1084.

Bilodeau-Goeseels S, Panish P. 2002. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Anim Reprod Sci* (71):143-155.

Blanco MR, Demyda S, Moreno M, Millán G, Genero E. 2011. Developmental competence of *in vivo* and *in vitro* matured oocytes: A review. *Biotech Mol Biol Rev* (6):155-165.

Blondin P, Sirard MA. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* (41):54-62.

- Boediondo A, Saha S, Sumantri C, Suzuki T, Rajamahendran R. 1995. Effect of the presence of a CL in the ovary on oocyte number, cleavage rate and blastocyst production *in vitro* in cattle. *Theriogenology* (43):169.
- Brackett B, Zuelke K. 1993. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryo. *Theriogenology* (39):43-64.
- Chaubal SA, Ferre LB, Molina JA, Faber DC, Bols PE, Rezamand P, Tian X, Yang X. 2007. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. *Theriogenology* (67):719-728.
- Chohan KR, Hunter A. 2003. Effect of reproductive status on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. *J Vet Sci* (4):67-72.
- De Loos F, Van Vliet C, Van Mauric P, Kruip TAM. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res* (24):189-204.
- Díaz T. 1999. Dinámica del desarrollo folicular ovárico durante el ciclo estral en el bovino. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela* (40):3-18.
- Díaz T. 2008. Dinámica folicular ovárica durante el ciclo estral en vacas doble propósito. En: *Desarrollo Sostenible de la Ganadería Doble Propósito*. C González-Stagnaro, N Madrid Bury, E Soto Belloso (eds). Fundación GIRARZ. Edic. Astro Data SA, Maracaibo-Venezuela. Cap. XLIV:309-322.
- Figueiredo RA, Barros CM, Pinheiro L, Soler JMP. 1997. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology* (47):1489-1505.

- Frei RE, Schultz GA, Church RB. 1989. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16 cell stage of embryogenesis in the cow. *J Reprod Fertil* (86):637-641.
- Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod* (55):1187-1194.
- Ginther OJ, Kot K, Kulic LJ, Wiltbank MC. 1997. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology* (48):**5-87**.
- Li HJ, Liu DJ, Cang M, Wang LM, Jin MZ, Ma YZ, Shorgan B. 2009. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. *Anim Reprod Sci* (114):89-98.
- Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De La Sota RL, Thatcher WW. 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci* (70):3615-3626.
- Machatkova M, Krausova K, Jokesova E, Tomanek M. 2004. Developmental competence of bovine oocyte: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. *Theriogenology* (61):329-335.
- Merton JS, de Roos APW, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Dieleman SJ. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo production technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* (59):651-674.
- Moreno JF, Flores-Foxworth G, Westhusin M, Kraemer DC. 1993. Influence of pregnancy and presence of a CL on quantity and quality of bovine oocytes obtained from ovarian follicles aspirated post-mortem. *Theriogenology* (39):271.

- Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann A. 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Dev* (31):63-67.
- Picton HM, Harris SE, Muruvi W, Chambers EL. 2008. The *in vitro* growth and maturation of follicles. *Reprod Rev* (136): 703-715.
- Pirestrani A, Morteza S, Hajian M, Forouzanfar M, Moulavi F, Avedi P, Gourabi H, Shahverdi A, Vosough A, Hossein M. 2010. Effect of ovarian cyclic status on *in vitro* embryo production in cattle. *Int J Fert Steril* (4):172-175.
- Salomone DF, Adams GP, Mapletoft RJ. 1999. Change in the cumulus oocyte complex of subordinate follicles relative to follicular wave status in cattle. *Theriogenology* (52):549-561.
- Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* (65):126-136.
- Sivakumaran K, Calder M, Rajamahendran R. 1991. The influence of reproductive status of bovine on oocyte number and maturation *in vitro* and the effect of coculture system on fertilization and subsequent development. *J Vet Sci* (69): 438.
- Tan SJ, Lu KH. 1990. Effects of different oestrus stage of ovaries and sizes of follicles on generation of bovine embryos *in vitro*. *Theriogenology* (33):335.
- Van Wagendonk-deLeeuw AM. 2006. Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. *Theriogenology* (65):914-925.

Vassena R, Mapletoft RJ, Allodi S, Singh J, Adams GP. 2003. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology* (60):923-932.

Ventromila MA, Ferreira AM, Sá WF. 1995. Observações qualitativas e quantitativas na população de folículos de bovinos mestiços Holandês/Zebu. *Rev Brasil Reprod Anim* (19):165-172.

Ward FA, Lonergan BP, Enright BP, Boland MP. 2000. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovum pick-up technology. *Theriogenology* (54):433-446.