

Evaluación citogenética de ovocitos de cabra madurados *in vitro*

Patricia C. Villamediana Monreal^{1*}, Francisco J. Báez Contreras¹,
Francesca F. Vidal² y María Teresa Paramio³

¹Laboratorio de Citogenética, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. ²Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. ³Departamento de Ciencias Animales y de los Alimentos. Universidad Autónoma de Barcelona, UAB, Bellaterra, Barcelona, España.

Recibido: 31-10-07 Aceptado: 16-07-08

Resumen

El objetivo de este estudio fue analizar las características citogenéticas de ovocitos madurados *in vitro* de cabras adultas y prepúberes recuperados mediante las técnicas de *slicing* o aspiración. Los complejos cúmulus-ovocito fueron obtenidos mediante dos procedimientos diferentes (*slicing* y aspiración) a partir de cabras prepúberes y adultas sacrificadas en matadero. Los ovocitos fueron madurados en TCM-199 suplementado con 20% de suero de donante bovino + 10 µg/mL FSH + 1 µg/mL 17β estradiol por 27 horas a 38 °C en 5% de CO₂ en aire. Al final del cultivo, los ovocitos madurados *in vitro* fueron expuestos a un tratamiento hipotónico y fijados en Carnoy. Los complementos cromosómicos fueron evaluados mediante tinción con Leishman. Un total de 145 y 229 ovocitos de cabras adultas y prepúberes, respectivamente, fueron evaluados. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los estadios meióticos entre ovocitos colectados por *slicing* y aspiración ni en el grupo de prepúberes ni en el de adultas. El porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadio de MII no difirió entre ovocitos de cabras prepúberes y adultas (95,3% vs. 95,2%, respectivamente). Un porcentaje de los ovocitos madurados *in vitro* mostraron figuras de MII no reducidas tanto en las cabras prepúberes como en las adultas. El porcentaje de MII no reducidas observadas fue mayor en ovocitos de cabras prepúberes que en las cabras adultas (16,09% vs. 4,90%, respectivamente, P < 0,05). Estos datos sugieren que, a pesar de la alta incidencia de MII no reducidas, los ovocitos de cabras prepúberes progresan meióticamente de la misma manera que los ovocitos de cabras adultas.

Palabras claves: ovocitos, cabra, MIV, análisis citogenético.

Cytogenetic evaluation of goat oocytes matured *in vitro*

Abstract

The aim of this study was to analyze the cytogenetic characteristics of *in vitro* matured oocytes from adult and prepubertal goats recovered by *slicing* or aspiration. Cumulus oocytes complexes were obtained by two different procedures (*slicing* and aspiration) from ovaries of slaughtered prepubertal and adult goats. Oocytes were matured in TCM-199 supplemented with 20% Donor Bovine Serum + 10 µg /mL FSH + 1 µg/mL estradiol 17β for 27 h at 38°C in 5%

* Autor para la correspondencia. E-mail: patriciavillamediana@cantv.net.

CO₂ in air. At the end of the culture, IVM oocytes were exposed to hypotonic treatment and fixed in Carnoy's fixative. Chromosome complements were evaluated by Leishman-staining. A total of 145 and 229 oocytes from adult and prepubertal goats, respectively, were evaluated. No significant differences were observed in any of the meiotic stages between the oocytes collected by slicing and aspiration in either prepubertal or adult group. The percentage of oocytes that reached the MII stage did not differ between oocytes from prepubertal and adult goats (95.3 vs. 95.2%, respectively). A percentage of *in vitro* matured oocytes showed unreduced MII figured for both prepubertal and adult goats. The observed percentage of unreduced MII was higher in oocytes from prepubertal goats than adult goats (16.09 vs. 4.90%, respectively, $P < 0.05$). The data suggest that, in spite of the higher incidence of unreduced MII, oocytes from prepubertal goats meiotically progress in the same manner as the oocytes from adult goats.

Key words: oocytes, goat, IVM, cytogenetic analysis.

Introducción

Los ovocitos recuperados de ovarios de hembras prepúberes sacrificadas en matadero han sido considerados una de las fuentes de ovocitos para la fecundación *in vitro* (FIV). Sin embargo, cuando se usan ovocitos de hembras inmaduras, la optimización de la maduración *in vitro* (nuclear y citoplasmática) es esencial para el éxito de la FIV. De hecho, los resultados publicados usando este material son variables dependiendo del laboratorio y de la especie utilizada (1, 2).

La maduración nuclear es un paso imprescindible para lograr una fecundación normal. El núcleo del ovocito reinicia la meiosis progresando desde el estadio de vesícula germinal (dictiotene) hasta bloquearse de nuevo en la metafase II. Muchos factores pueden afectar la finalización de la meiosis. La edad de la hembra donante de ovocitos es uno de esos factores. Diversos autores no han hallado diferencias en los resultados de maduración entre los ovocitos de hembras adultas y los ovocitos procedentes de hembras prepúberes tratadas o no hormonalmente (caprino: Martino *et al.* (3), Mogas *et al.* (4); ovino: Ledda *et al.* (5); bovino: Armstrong *et al.* (6), Revel *et al.* (7), Damiani *et al.* (8), O'Brien *et al.* (9)), mientras que otros estudios describen que los ovocitos provenientes de ovarios prepúberes no reinician la meiosis como lo hacen los proce-

dentos de adultas (10). Wiesak *et al.* (11), trabajando con ovocitos obtenidos mediante disección folicular a partir de ovarios de cerdas cíclicas y prepúberes, ambas tratadas hormonalmente, encontraron diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos en vesícula germinal (VG) (3,3% vs. 42,1%, respectivamente) pero no en el de ovocitos en metafase II (MII) (18,3% vs. 21,4%, respectivamente). Koenig y Stormshak (12), en su estudio citogenético de ovocitos de cerdas cíclicas (tercer ciclo) y púberes, observaron que las hembras púberes ovulan un mayor porcentaje de ovocitos inmaduros (VG) (33,3%) que las hembras cíclicas (24,1%); el porcentaje de ovocitos maduros también fue significativamente distinto (66,7% vs. 75,9%, respectivamente). Igualmente encontraron que la frecuencia estimada de no-disyunción fue mayor entre los ovocitos de hembras púberes que entre las cíclicas. En su trabajo, Ledda *et al.* (13) observaron que la tasa de progresión meiótica es significativamente menor en ovocitos de ovejas jóvenes (8%) que en los ovocitos de adultas (58%) cuando no se añaden gonadotropinas en el medio de cultivo.

Respecto al diámetro folicular, diversos estudios han demostrado su correlación con la capacidad del ovocito de madurar, ser fecundado y desarrollarse *in vitro* (14, 15). Lechniak *et al.* (16) investigaron la relación entre la ploidía de ovocitos bovinos madurados

in vitro y su diámetro, y concluyeron que los ovocitos de mayor tamaño llevan a cabo las divisiones meióticas de manera normal, mientras que sus contrapartes de menor tamaño tienden a seguir una vía anormal de maduración. Yang *et ál.* (17), en su estudio sobre el control de la maduración de ovocitos bovinos provenientes de hembras adultas, observaron que las tasas de maduración, división y desarrollo embrionario son significativamente menores en los ovocitos provenientes de folículos pequeños (< 2 mm) que en los provenientes de folículos medianos (2-5 mm) y grandes (5-8 mm). Crozet *et ál.* (18) encontraron resultados similares en ovocitos de cabras y reportaron diferencias en la tasa de maduración, división y desarrollo embrionario entre los ovocitos provenientes de folículos pequeños (2-3 mm), medianos (3,1-5 mm) y grandes (> 5 mm). Martino *et ál.* (19) observaron que en cabras prepúberes deben usarse folículos con más de 2,5 a 3 mm para obtener ovocitos meióticamente competentes. Los métodos usados comúnmente para recuperar ovocitos son la aspiración folicular y las técnicas de recogida en masa. Usando el método de aspiración se pueden seleccionar los folículos de más de 2,5 mm, mientras que la población de ovocitos obtenida mediante *slicing* es mucho más heterogénea en cuanto al diámetro folicular y del ovocito.

La tinción con lacmoid se ha utilizado para evaluar la maduración (MIV), como control previo a la FIV (3, 4, 13, 20, 21). Sin embargo, la estimación de la maduración del ovocito usando esta metodología no es un método muy preciso, principalmente debido a que el estadio meiótico es evaluado indirectamente mediante la observación del primer corpúsculo polar. Las técnicas citogenéticas pueden utilizarse para una evaluación más precisa de la progresión nuclear durante la MIV. Se han realizado estudios citogenéticos con ovocitos de diversas especies de animales domésticos con el objetivo de evaluar la MIV. Cerdo: McGaughey y Polge, 1971, citado por King (22); Koenig

y Stormshak (12); Sosnowski *et ál.* (23). Bovino: King *et ál.* (24), Ectors *et ál.* (25), Sosnowski *et ál.* (26) y Lechniak *et ál.* (16). Oveja: Jagiello *et ál.*, 1974, citado por King (22). Yegua: Brinsko *et ál.* (27). Cuatro configuraciones cromosómicas básicas de la MII en ovocitos han sido observadas: la MII haploide, MII hipohaploides e hiperhaploides (aneuploides) y MII diploide.

Los estudios citogenéticos con ovocitos de cabra se han centrado en el estudio de la secuencia temporal de las divisiones meióticas (24, 25) y no se tiene conocimiento de estudios que describan las características citogenéticas de ovocitos de cabras adultas y prepúberes madurados *in vitro*.

El objetivo final de los estudios realizados en este trabajo fue comprobar si las anomalías cromosómicas de los ovocitos eran responsables del bajo número de blastocistos caprinos obtenidos en nuestras condiciones de cultivo. Para lograr esto se planteó llevar a cabo un análisis citogenético que permitiera evaluar la progresión meiótica de la maduración *in vitro* en ovocitos de cabra, determinando además el efecto de la técnica de recogida de ovocitos y la edad de la donadora.

Materiales y métodos

Colección de ovocitos

Los ovarios de cabras prepúberes (aproximadamente de 2 meses de edad) y adultas (multíparas y no preñadas) fueron recogidos en un matadero comercial y transportados al laboratorio en PBS (P-4417, Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado con gentamicina (50 mg/L) a 35-37 °C en contenedores isotérmicos. Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron lavados en PBS + gentamicina a 38,5 °C. Los complejos cúmulus-ovocito fueron recuperados mediante dos métodos distintos. El método de *slicing*, que consiste en cortar sucesivamente la superficie del ovario con una hoja de bisturí en una placa de petri que contiene medio TCM-199 (M-2520, Sigma) suplementado con 2,2

mg/mL NaHCO₃, 50 g/mL de gentamicina y 1 l mg/L de heparina (H-3393, Sigma), liberándose ovocitos provenientes de folículos de cualquier tamaño; y el método de aspiración, mediante el cual se realizó la punción de todos los folículos visibles en la superficie del ovario que tuvieran más de 2,0 mm de diámetro, con ayuda de una jeringa de 1 mL unida a una aguja de 21 g.

Maduración *in vitro*

Se seleccionaron aquellos ovocitos con más de una capa compacta de cúmulos, y citoplasma homogéneo. La MIV se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Mogas *et al.* (4). El medio de maduración fue el TCM-199/HEPES (M-7528, Sigma) suplementado con 275 mg/L de piruvato sódico (P-2256, Sigma), 50 µg/mL de gentamicina, 146 mg/L de l-glutamina (G-5763, Sigma), 20% de DBS (suero de donante bovino, CanSera, Rexdale, Ontario, Canada), 10 µg/mL de o-FSH (Ovagen, Immuno Chemicals Products LTD, New Zealand), 10 µg/mL de LH (proporcionada por J.F. Beckers, IRSIA Research Unit, University of Liege, Belgium) y 1 µg/mL estradiol-17β (E-2257, Sigma). Los complejos cúmulus-ovocito fueron cultivados en grupos de 20 en microgotas de 100 µL de medio cubiertas con aceite mineral (M-3516, Sigma) durante 27 horas a 38,5 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ en aire saturado de humedad.

Estudio citogenético

Las extensiones cromosómicas se prepararon siguiendo la metodología descrita por Brewen y Preston (28) con pequeñas modificaciones. Después del cultivo, los ovocitos fueron colocados en placas pequeñas que contenían citrato sódico al 0,3% durante 10 minutos (tratamiento hipotónico) y fijados mediante tres pases de 12 minutos cada uno en solución fijadora de metanol y ácido acético (3:1). Una vez fijados, los ovocitos fueron transferidos a portaobjetos previamente desengrasados.

Las preparaciones cromosómicas se tiñeron con colorante de Leishman (Cod 251378, Panreac, Montplet & Esteban S.A., Barcelona, España) al 20% en tampón de Leishman (BDH Laboratory Supplies, Poole, BH15 1TD, England) durante 8 minutos. Se evaluó el estadio meiótico y la ploidía (haploide o diploide) de los ovocitos bajo fotomicroscopio de contraste de fases (Olympus, BX40). De acuerdo con las figuras meióticas observadas, los ovocitos fueron clasificados como: profase I, metafase I, anafase-telofase I y metafase II.

Hubo casos en los que fue imposible contar el número exacto de cromosomas. En estos casos un ovocito fue considerado diploide cuando el número de cromosomas claramente identificables fue mayor de 45.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con un Test de Chi-cuadrado bajo la aplicación del paquete estadístico SAS® (29). Las diferencias fueron consideradas significativas para valores de P < 0,05.

Resultados

En la tabla 1 se presentan las características citogenéticas de los ovocitos estudiados.

De los 355 ovocitos madurados *in vitro* provenientes de cabras prepúberes (recuperados por *slicing* y por aspiración), se pudieron realizar extensiones cromosómicas de 297 de ellos, de los cuales 229 fueron analizados citogenéticamente. Los 68 restantes fueron descartados por la poca calidad de las extensiones (superposición de cromosomas, abundantes restos celulares o dificultad para reconocer el estadio meiótico). El análisis citogenético reveló que la maduración nuclear (figuras en metafase II, figura 1AB) se consiguió en 218 de los ovocitos analizados (95,2%). Sin embargo, 35 de estos ovocitos en MII (16,1%) mostraron un número diploide de cromosomas (figura 1C).

Tabla 1
Características citogenéticas de ovocitos de cabras adultas y prepúberes.

Ítem	Prepúberes						Adultas					
	Slicing		Aspiración		Total		Slicing		Aspiración		Total	
	Nº	%fix %anal	Nº	%fix %anal	Nº	%fix %anal	Nº	%fix %anal	Nº	%fix %anal	Nº	%fix %anal
Total fix	168		129		297		91		54		145	
Total anal	123	73,2	106	82,2	229	77,1	66	72,5	41	75,9	107	73,8
Profase I	1	0,6	2	1,6	3	1,0	1,3	1	1,1	1,5	2	1,4
MI	1	0,6	1	0,8	2	0,7	0,9	2	2,2	3,0	3	2,1
Ana-Telo I	4	2,4	2	1,6	6	2,0	2,6					
MII total	117	69,6	101	78,3	218	73,4	95,2	63	69,2	95,5	39	72,2
MII n	102	60,7	81	62,8	183	61,6	79,9 ^a	60	65,9	90,9	37	68,5
MII 2n	15	8,9	20	15,5	35	11,8	15,3 ^a	3	3,3	4,5	2	3,7

^{a, b}: valores en la misma columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0,05$).
%fix: porcentajes basados en el total de ovocitos fijados; %anal: porcentajes basados en el total de ovocitos analizados.

De los 147 ovocitos madurados *in vitro* procedentes de cabras adultas, fueron extendidos 145 para el análisis cromosómico, de los cuales 107 pudieron ser evaluados citogenéticamente. Ciento dos ovocitos (95,3%) progresaron hasta el estadio de MII, 5 de los cuales (4,9%) presentaron un número diploide de cromosomas.

Del total de ovocitos fijados, el porcentaje de ovocitos no-analizables no difiere entre los ovocitos provenientes de cabras prepúberes y los de adultas (22,9% vs. 26,2%, respectivamente), ni entre los ovocitos recuperados por *slicing* o aspiración (27,0% vs. 24,0%, respectivamente). No se observaron diferencias significativas en ninguno de los estadios meióticos entre ovocitos recogidos por aspiración y *slicing* tanto en el grupo prepúber como en el de adultas.

El porcentaje de MII totales (reducidas + no reducidas) no difiere entre los ovocitos provenientes de cabras prepúberes y los de adultas (95,2% vs. 95,3%, respectivamente). Sin embargo, sí se observó una diferencia significativa en el porcentaje de ovocitos en MII reducida y no reducida entre los provenientes de cabras prepúberes y los de las adultas (MII: 79,9% vs. 90,7%; MII2n: 15,3% vs. 4,7%, respectivamente).

Discusión

El estadio meiótico de los ovocitos en el momento de la fecundación tiene un impacto directo sobre el éxito final de la fecundación. Se sabe que el estadio de MII es el óptimo, y al evaluar el proceso de maduración *in vitro*, este se da por completado cuando se observa el mayor porcentaje de ovocitos en MII (30).

Se han publicado numerosos resultados acerca de las diferencias en el desarrollo de los ovocitos recuperados por distintos métodos (*slicing*/aspiración). Takagi *et ál.* (31), con ovocitos bovinos; Ahmed y Kandil (32), con ovocitos bubalinos; y Keskin-tepe *et ál.* (33), con ovocitos caprinos, encontraron

diferencias en las tasas de fecundación y de desarrollo embrionario entre los ovocitos recuperados por *slicing* y por aspiración. Arlotta *et ál.* (34) y Hamano y Kuwayama (35), con ovocitos bovinos, y Pawshe *et ál.* (36), con ovocitos caprinos, no encontraron diferencias en ninguno de los parámetros valorados (MIV, división, desarrollo embrionario) entre los ovocitos recuperados mediante dichas técnicas. En nuestro estudio no se observaron diferencias significativas en el número de ovocitos recuperados por aspiración o *slicing* que alcanzaron el estadio de MII después de 27 horas de cultivo (140/147 vs. 180/189). Estudios realizados por Martino *et ál.* (37) describen una tasa menor de maduración en ovocitos de cabra recuperados por *slicing* que en ovocitos recuperados por aspiración o disección de folículos. Esta discrepancia en los resultados puede deberse a que la selección de ovocitos obtenidos por *slicing*, método utilizado corrientemente en nuestro laboratorio durante todos estos años, se ha hecho más estrictamente.

El porcentaje de retraso o bloqueo de la maduración meiótica (observación de figuras de profase I, metafase I y anafase I) fue el mismo en cabras adultas (4,8%) y prepúberes (4,6%). Este porcentaje es menor que los observados en estudios previos en cabras: 29,9% (3), 10% (38) y 22,1% (39). Estas diferencias pueden deberse al hecho de que con la tinción de lacmoid, las MII no reducidas pudieron ser clasificadas como MI.

Para nuestro conocimiento, estos son los primeros datos de metafases II diploides observadas en ovocitos de cabras madurados *in vitro*. El porcentaje de MII no reducidas en los ovocitos de cabras adultas en nuestro estudio (4,67%) es similar al observado después de la MIV de ovocitos bovinos: 2,93% (26), 8,6% (40) y 9,2% (26); de ratón: 1,31% (41); porcinos: 5,9% (12) y 12,8% (23); y de caballos: 16,6% (27).

Los ovocitos en metafase II con un número diploide de cromosomas pueden tener su origen en la falta de extrusión del primer

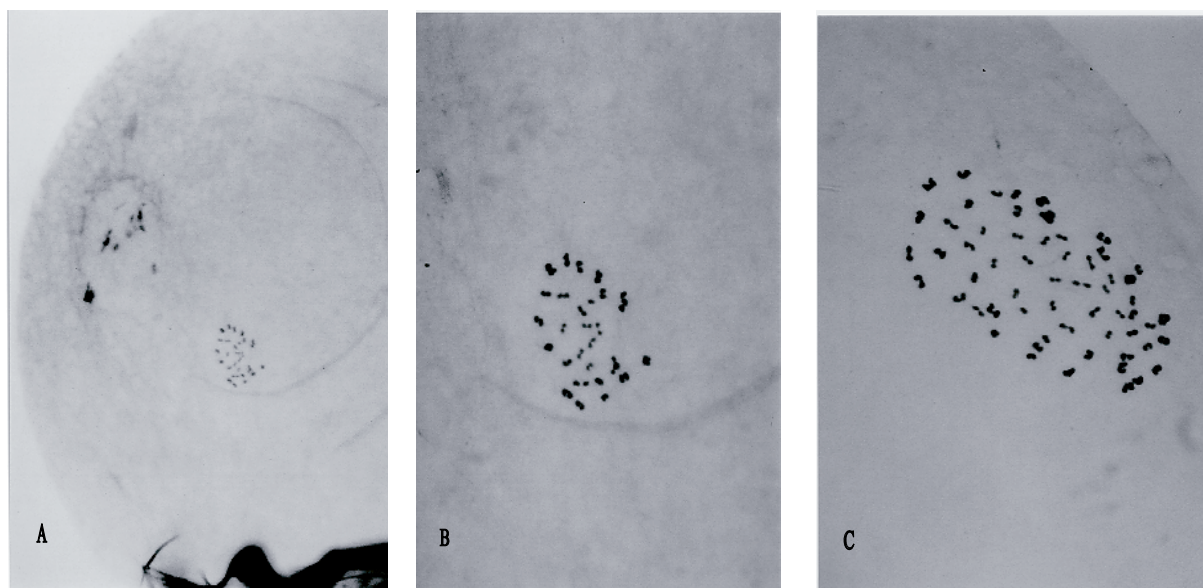


Figura 1. Estadios meióticos observados en ovocitos de cabra madurados *in vitro*. A) Metafase II haploide normal; cp: corpúsculo polar (x10). B) x100. C) Metafase II diploide (x100).

corpúsculo polar. La dinámica de la expulsión del corpúsculo polar puede verse alterada por factores ambientales como la temperatura (42), el tiempo de cultivo (43), la concentración hormonal en el medio de maduración (41) o el suero añadido al medio de maduración (44). Los ovocitos diploides también pueden originarse, bien por la fusión citoplasmática de dos ovogonias, resultando un ovocito gigante en MII, o bien por la formación de un ovocito primario tetraploide producto de una división nuclear sin citocinesis (45). En individuos diploides normales, pueden producirse espontáneamente, con baja frecuencia, ovocitos y espermatozoides tetraploides, como se ha descrito en ratones (46) y en gallinas (47). El origen de estas células germinales anormales pudiera estar en un fenómeno de endorreduplicación en las ovogonias/espermatogonias o en una división celular incorrecta en la cual no se produzca la cariocinesis (división del núcleo). Lim *et ál.* (48) han observado muchos ovocitos humanos diploides de tamaño normal, y han explicado que estos podrían ser el

resultado de un fallo en la división celular después de la duplicación nuclear.

Los ovocitos diploides pueden dar origen a embriones triploides después de la fecundación normal de estos ovocitos. Jacobs *et ál.* (49) y Uchida y Freeman (50), haciendo un estudio de los abortos espontáneos de fetos triploides en humanos, encontraron que entre 22,6% y 29% de las triploidías se debían a ovocitos diploides.

En nuestro estudio, el porcentaje de ovocitos diploides fue mayor en cabras prepúberes que en adultas (15,3% vs. 4,67%). Esta diferencia es comparable a la observada en ovocitos ovulados de cerdas púberes (10,8%) y cerdas con tres ciclos estrales (5,9%) por Koenig y Stormshak (12). Catalá *et ál.* (51) observaron que los ovocitos diploides como causa de embriones triploides eran más comunes en hembras de ratón prepúberes (2,61%) que en jóvenes (0,34%) y en las de edad avanzada (0,53%). Muchas teorías han sido postuladas estableciendo que el desequilibrio hormonal producido al comienzo y al final de la vida reproductiva de la

hembra puede ser decisivo en la aparición de anomalías cromosómicas: Lyon y Hawker, 1973; Crowley *et ál.*, 1979, citados por Catalá *et ál.* (51).

Las frecuencias de gametos femeninos cromosómicamente anormales varían de acuerdo con la especie examinada. En el caballo y en el cerdo se han observado frecuencias de ovocitos cromosómicamente anormales de 7,9% y 15,5%, respectivamente (22). En bovinos, la frecuencia varía entre 1,9% y 16,5% (24, 23, 52). En humanos, el porcentaje de ovocitos desequilibrados cromosómicamente parece ser bastante alto, y se ha estimado en un 35% (53).

En conclusión, la técnica de recogida de ovocitos no afecta la progresión meiótica en ovocitos de cabras adultas ni prepúberes. La edad de la hembra donante de ovocitos no afecta el porcentaje de ovocitos que alcanzan el estadio de MII, pero sí afecta la frecuencia de MII reducidas y no reducidas. Sin embargo, esta relativamente pequeña proporción de MII anormales no parece ser la única responsable de las controvertidas diferencias observadas en la capacidad de desarrollo de los ovocitos madurados y fecundados *in vitro* provenientes de hembras adultas y prepúberes.

Conclusiones

Los ovocitos madurados *in vitro* de cabras prepúberes alcanzan el estadio de MII en la misma proporción que los de las adultas, independientemente de la técnica de recogida de ovocitos utilizada. Los ovocitos madurados *in vitro* provenientes de cabras prepúberes presentan un porcentaje mayor de ovocitos con MII diploides que los provenientes de cabras adultas.

Referencias bibliográficas

- IKEDA K., TAKAHASHI Y. *Reproduction Fertility and Development* 15: 215-221, 2003.
- VELILLA E., RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ E., VIDAL F., IZQUIERDO D., PARAMIO M. *Molecular Reproduction and Development* 73: 617-626, 2006.
- MARTINO A., MOGAS T., PALOMO M.J., PARAMIO M.T. *Theriogenology* 41: 969-980, 1994a.
- MOGAS T., PALOMO M.J., IZQUIERDO M.D., PARAMIO M.T. *Theriogenology* 47: 1189-1203, 1997.
- LEDDA S., BOGLIOLO L., LEONI G., NAITANA S. *Biol. Reprod.* 65: 247-252, 2001.
- ARMSTRONG D.T., HOLM P., IRVINE B., PETERSEN B.A., STUBBINGS R.B., MCLEAN D., STEVENS G., SEAMARK R.F. *Theriogenology* 38: 667-678, 1992.
- REVEL F., MERMILLOD P., PEYNOT N., RENARD J.P., HEYMAN Y. *J. Reprod. Fert.* 103: 115-120, 1995.
- DAMIANI P., FISSORE R.A., CIBELLI J.B., LONG C.R., BALISE J.J., ROBL J.M., DUBY R.T. *Mol. Reprod. Dev.* 45: 521-534, 1996.
- O'BRIEN J.K., CATT S.L., IRELAND K.A., MAXWELL W.M., EVANS G. *Theriogenology* 47: 1433-1443, 1997.
- GANDOLFI F., VASSENA R., LAURIA A. *Reproduction in Domestic Animals* 35: 66-71, 2000.
- WIESAK T., HUNTER M.G., FOXCROFT G.R. *J. Reprod. Fertil.* 89: 663-641, 1990.
- KOENING J.L., STORMSHAK F. *Biol. Reprod.* 49: 1158-1162, 1993.
- LEDDA S., BOGLIOLO L., CALVIA P., LEONI G., NAITANA S. *J. Reprod. Fert.* 109: 73-8, 1997.
- TROUNSON A., ANDERIESZ C., JONES G. *Reproduction* 121: 51-57, 2001.
- SHIRAZI A., SADEGHI N. *Small Ruminant Research* 69: 103-107, 2007.
- LECHNIAK D., KACZMAREK D., STANISAWSKI D., ADAMOWICZ T. *Theriogenology* 57: 1303-1308, 2002.
- YANG X., KUBOTA C., SUZUKI H., TANEJA M., BOLS P.E., PRESICCE G.A. *Theriogenology* 49: 471-482, 1998.
- CROZET N., AHMED-ALI M., DUBOS M.P. *J. Reprod. Fertil.* 103: 293-298, 1995.
- MARTINO A., PARAMIO M.T., MOGAS T., PALOMO M.J. *Proc. XI Int. Congr. Anim. Re-*

- prod.** The Hague (Netherlands), 1: 360-362, 1992.
20. PAWSHE C.H., PALANISAMY A., TANEJA M., JAIN S.K., TOTEY S.M. *Theriogenology* 46: 971-982, 1996.
 21. IZQUIERDO D., VILLAMEDIANA P., PALOMO M.J., MOGAS T., PARAMIO M.T. *Theriogenology* 49(8): 1501-1513, 1998.
 22. KING W.A. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 23: 229-250, 1990.
 23. SOSNOWSKI J., WAROCZYK M., SWITONSKI M. *Theriogenology* 60 (3): 571-581, 2003.
 24. KING W.A., BOUSQUET D., GREVE T., GOFF A.K. *Acta Vet. Scand.* 27: 267-279, 1986.
 25. ECTORS F.J., KOULISCHER L., JAMAR M., HERENS C., VERLOES A., REMY B., BECKERS J-F. *Theriogenology* 44: 445-450, 1995.
 26. SOSNOWSKI J., SWITONSKI M., LECHNIAK D., MOLINSKI K. *Theriogenology* 45: 865-872, 1996.
 27. BRINSKO S.P., BALL B.A., ELLINGTON J.E. *Theriogenology* 44: 461-469, 1995.
 28. BREWEN J.G., PRESTON R.J. In: Hsu T. (Ed.). *Cytogenetic assays of environmental mutagens*. Allanheld, Osmun and Co., Totowa (USA), pp. 277-287, 1982.
 29. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS). SAS/STAT. *User's guide*. 8.2 Edition, Cary (USA), 2001.
 30. GORDON I. *Laboratory production of cattle embryos*. CAB International, Wallingford (England), 1994.
 31. TAKAGI Y., MORI K., TAKAHASHI T., SUGAWARA S., MASAKI J. *J. Anim. Sci.* 70: 1923-1927, 1992.
 32. AHMED S.S., ABDON N., OMAIMA M. *Reproduction Nutrition and Development* 41: 71-77, 2001.
 33. KESKINTEPE L., DARWISH G.M., KENIMER A.T., BRACKETT B.G. *Theriogenology* 42: 527-535, 1994.
 34. ARLOTTO T.M., LEIBFRIED-RUTLEDGE M.L., FIRST N.L. *Theriogenology* 33: 188 [Abstr], 1990.
 35. HAMANO S., KUWAYAMA M. *Theriogenology* 39: 703-712, 1993.
 36. PAWSHE C.H., TOTEY S.M., JAIN S.K. *Theriogenology* 42: 117-125, 1994.
 37. MARTINO A., PALOMO M.J., MOGAS T., PARAMIO M.T. *Theriogenology* 42: 859-873, 1994b.
 38. DE SMEDT V., CROZET N., AHMED ALI M., MARTINO A., COGNIE Y. *Theriogenology* 37: 1049-1060, 1992.
 39. YADAV B.R., KATIYAR P.K., CHAUHAN M.S., MADAN M.L. *Theriogenology* 47: 943-951, 1997.
 40. LECHNIAK D., SWITONSKI M., SOSNOWSKI M. *Theriogenology* 46: 267-277, 1996.
 41. A'ARABI S.Y., ROUSSEL J.D., CHANDLER J.E. *Theriogenology* 48: 1173-1183, 1997.
 42. AMAN R.R., PARKS J.E. *Biol. Reprod.* 50: 103-110, 1994.
 43. BADENAS J., SANTALÓ J., CALAFELL J.M., ESTOP A.M., EGOZCUE J. *Gamete Research* 24: 205-218, 1989.
 44. PALACIOS M., DENNINSON R., REGGIO B., GODKE R., ECHELARD Y., OVERSTROM E.W. *Theriogenology* 49: 317 [Abstr], 1998.
 45. KAMIGUCHI Y., ROSENBUSCH B., STERZI K., MIKAMO K. *Human Genet.* 90, 533-541, 1993.
 46. SOLARI A.J., MOSES M.J. *Exp. Cell. Res.* 103: 464-467, 1977.
 47. SOLARI A.J., FECHHEIMER N.S. *Genome* 30: 900-902, 1988.
 48. LIM A.S.T., HO A.T.N., TSAKOK M.F.H. *Human Reprod.* 10 (10): 2570- 2575, 1995.
 49. JACOBS P.A., SZULMAN A.E., FUNKHOUSER J., MATSUURA J.S., WILSON C.C. *Ann. Hum. Genet.* 46: 223-231, 1982.
 50. UCHIDA I.A., FREEMAN V.C. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 151(1): 65-69, 1985.
 51. CATALÁ V., ESTOP A.M., SANTALÓ J., EGOZCUE J. *Cytogenet. Cell. Genet.* 48: 233-237, 1988.
 52. YADAV B.R., KING W.A., XU K.P., POLLARD J.W., PLANTEL. *Genet. Sel. Evol.* 23: 191-196, 1991.
 53. ZENZES M.T., CASPER R.F. *Human. Genet.* 88: 367-375, 1992.