

## Efecto del medio de cultivo sobre el desarrollo embrionario bovino *in vitro*

### Effect of culture medium on *in vitro* bovine embryo development

Mónica de los Reyes Solovera\*  
José Antonio Stuardo Rosales\*  
Claudio Barros Rodríguez\*\*

---

#### Abstract

The aim of this study was to compare the effect of three different culture media on the *in vitro* embryo development of *in vitro* fertilized bovine oocytes. The three culture media used were: a) control medium (TCM-199 + 10 mg/ml BSA), b) control medium that had been conditioned by co-incubation with bovine oviductal epithelial cells (BOEC) and, c) control medium plus 5 mg/ml insulin, 5 mg/ml transferrin and 5 mg/ml selenium (ITS). *In vitro* fertilized oocytes were incubated separately in each one of these media for six days. At 24 h of incubation, the cleavage rates were: 44.9%, 44.1% and 43%, respectively ( $P > 0.05$ ). However, embryo development up to early blastocyst stage (six days of culture) was greater ( $P < 0.05$ ) in TCM-199 + ITS medium (20.3%) as compared to the other two media used (12.3% and 1.7% in TCM + BOEC medium and control medium, respectively).

**Key words:** EMBRYO DEVELOPMENT, BOVINE, CULTURE MEDIUM.

#### Resumen

Este trabajo comparó el efecto de tres medios de cultivo sobre el desarrollo embrionario de ovocitos bovinos fecundados *in vitro*. Se utilizaron tres medios: a) Medio testigo (TCM - 199 + 10 mg/ml), b) medio testigo con células epiteliales del oviducto bovino (BOEC) y c) medio testigo más 5 mg/ml insulina, 5 mg/ml transferrina y 5 mg/ml selenio (ITS). Los ovocitos fecundados *in vitro* se incubaron separadamente en cada uno de los medios de cultivo durante seis días. Los resultados mostraron que después de 24 h de incubación los porcentajes de desarrollo al estado de dos células fueron de 44.9 44.1 y 43, respectivamente ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, el desarrollo hasta el estado blastocisto temprano (seis días de cultivo) fue mayor ( $P < 0.05$ ) en medio TCM - 199 + ITS (20.3%) comparado con los otros dos medios utilizados (12.3% y 1.7%) en TCM + BOEC y testigo, respectivamente.

**Palabras clave:** DESARROLLO EMBRIONARIO, BOVINO, MEDIO DE CULTIVO.

---

Recibido el 29 de abril de 2003 y aceptado el 17 de septiembre de 2003.

\* Laboratorio de Reproducción, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Departamento de Fomento de la Producción Animal, Universidad de Chile, Casilla 2, Correo 15, La Granja, Santiago, Chile

\*\* Laboratorio de Embriología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Alameda 340, Santiago, Chile.

Solicitud de reimpresiones: Mónica de los Reyes: mdlreyes@uchile.cl

Culture medium plays an important role for preimplantation development of mammalian embryos to be kept alive in order to be transferred. It has been determined that bovine embryo coculture with somatic cells such as granulosa cells,<sup>1</sup> trophoblastic vesicles,<sup>2</sup> and particularly bovine oviductal epithelial cells (BOEC),<sup>3,4</sup> would improve the rate of development to get to the blastocyst stage. The mechanism by which these cells could contribute to early development is still not well understood. BOEC could secrete growth factors that would enhance development.<sup>5</sup> However the possible disadvantages of a system of this type would be the release of embryotoxic substances, changes in the concentration of culture medium components and the inability to define the beneficial factors for embryonic developments, thus making it impossible to standardize the system.<sup>6</sup> A given culture medium that allows preimplantation development without the contribution of somatic cells would allow us to better understand the biochemical requirements for early embryonic development.<sup>7</sup> The contribution of insulin, transferrin and selenium is very important for most of the cell lines.<sup>8,9</sup> In vitro culture of mouse<sup>10</sup> and bovine<sup>11,12</sup> embryos has shown some promising results. Insulin is a potent mitogenic and differentiation inductor in bovine embryos.<sup>12-14</sup> Transferrin stimulates cell proliferation and morphogenesis.<sup>15</sup> Selenium, on the other hand, is in the active site of the glutathion peroxidase enzyme, thus regulating the biological activity of the enzyme and protecting the cells from the oxidative damage in cell cultures.<sup>16</sup>

In the present study we compared the in vitro embryonic development in a culture medium containing insulin, transferrin and sodium selenium in defined amounts and the development in culture medium supplemented with oviductal cells.

In vitro mature bovine oocytes were inseminated in vitro with frozen thawed bull spermatozoa using Fert-TALP<sup>17</sup> culture medium (fecundation evaluated by spermatid decondensation in the ovular cytoplasm) and were placed in 50 µl drops in each of the media used. The fertilized oocytes, 682 in total, were distributed in three different culture media to be evaluated: a) Control. Containing TCM 199 (Gibco #12340-030), supplemented with 10 mg/ml of Fraction V BSA\*, 0.1 mM sodium pyruvate, 100 IU/ml of sodium penicillin and 100 µg/ml streptomycin. b) TCM + BOEC. This culture medium was made up of control medium and bovine oviductal cells (BOEC) that were prepared according to Eyestone and First<sup>3</sup>. The BOEC were added to the control culture medium in a proportion of 1:20 (1 ml solution with cells and 20 ml of culture medium). From this medium 100 µl drops were prepared and the eggs placed in

El medio de cultivo cumple un rol fundamental para el desarrollo de preimplantación de embriones para que sean viables y puedan ser transferidos. Se ha determinado que el cocultivo embrionario bovino con células somáticas, tales como células de la granulosa,<sup>1</sup> vesículas trofoblásticas<sup>2</sup> y, principalmente, células del epitelio oviductal bovino (BOEC),<sup>3,4</sup> mejorarían la tasa de desarrollo hasta la etapa de blastocistos. El mecanismo por el cual contribuyen al desarrollo embrionario temprano es aún poco conocido. Las BOEC secretarían factores de crecimiento que estimulan el desarrollo.<sup>5</sup> Sin embargo, las desventajas de este sistema serían la posible liberación de sustancias embriotóxicas, modificaciones en la concentración de los constituyentes del medio y la incapacidad de definir los factores que pueden ser beneficiosos para el desarrollo embrionario, imposibilitando la estandarización del sistema.<sup>6</sup> Un medio que sustente el desarrollo preimplantacional, independiente de células somáticas permitiría entender mejor los requerimientos del desarrollo embrionario temprano.<sup>7</sup> El cultivo con insulina, transferrina y selenio es esencial para la mayoría de las líneas celulares.<sup>8,9</sup> En cultivo embrionario de ratón<sup>10</sup> y de bovinos<sup>11,12</sup> ha mostrado algunos resultados favorables. La insulina es un potente agente diferenciador y mitogénico en embriones bovinos.<sup>12-14</sup> La transferrina actúa estimulando la proliferación celular y la morfogénesis.<sup>15</sup> El selenio es un constituyente del sitio activo de la enzima glutathion peroxidasa, regulando de esta forma su actividad biológica y previniendo el daño oxidativo en cultivos celulares.<sup>16</sup>

En este trabajo se evaluó, el desarrollo embrionario in vitro en un medio de cultivo con insulina, transferrina y selenito de sodio en cantidades definidas, y su comparación con el desarrollo embrionario en medio suplementado con células oviductales bovinas.

Ovocitos bovinos madurados e inseminados in vitro con espermatozoides congelados y descongelados incubados en medio Fert-TALP<sup>17</sup> (fecundación evaluada por decondensación espermática en el citoplasma ovular) se colocaron en gotas de 50 µl en cada uno de los siguientes medios de cultivo. Se evaluaron 682 ovocitos fecundados, distribuidos en los tres medios de cultivo a estudiar: a) Testigo. Compuesto por TCM 199 (Gibco #12 340-030), suplementado con 10 mg/ml de BSA, fracción V,\* 0.1 mM de piruvato; 100 UI/ml de penicilina G sódica y 100 µg/ml de estreptomycin. b) TCM + BOEC. Este medio estuvo constituido por el medio control más las células oviductales bovinas (BOEC), que se prepararon con base en lo descrito por Eyestone y First.<sup>3</sup> Las BOEC se adicionaron al medio de cultivo testigo en una proporción de 1:20 (1 ml de solución con células en 20 ml de medio). De este medio

\* Sigma<sup>®</sup> St Louis, Missouri, USA.

them. Every 48 hours 50% of the culture medium was replaced with fresh medium. c) TCM+ ITS. That is, control culture medium containing 5 µg/ml insulin, 5 µg/ml transferrin and 5 µg/ml sodium selenite (ITS, Sigma # 1884). With this culture medium, 100 ml were prepared in tissue culture Petri dishes (Falcon®, #3001).

The percentage of embryonic development was analyzed using G-test of independence, and Bon Ferroni test was used to determine the existence of significant differences between the mediums.<sup>18</sup>

The percent of embryonic development was evaluated at 24 h and at the sixth day of incubation in each of the culture media.

At 24 h of incubation there were no significant differences in the three culture media used, as evaluated by the occurrence of the first cleavage division ( $P > 0.05$ ) (Figure 1A, Table 1). Development at the sixth day of culture showed that control culture medium development was lower as compared to the other two media used (Table 1). Preimplantational development in control medium was blocked at the two-cell stage (Figure 1A), and only 1.7 % reached the blastocyst stage. Supplementation of culture medium with insulin, transferrin and sodium selenite allowed a higher percentage of embryos (20.3%,  $P < 0.05$ ) to reach the early blastocyst stage (Figure 1B), when compared to the development reached when using control medium supplemented with BOEC (12.3%).

No morphological differences were observed (cell size and cell form) in the different stages of development in the different culture media used.

The addition of bovine serum albumin protects early embryonic development due to its chelant properties against toxic media components and also to its membrane stabilizer properties, as well as providing the traditional protein supplementation.<sup>6,19</sup> Zygotes of different domestic species could reach a more advanced stage of development in simple culture media supplemented with blood serum or serum albumin.<sup>20</sup> However in this study we found that the presence of serum albumin by itself was not enough to allow development to more advanced stages, as demonstrated by the low yield of blastocysts obtained in the control medium. Some studies have confirmed that different lots of serum albumin could affect embryonic development, including that of bovines, due to the presence or absence of compounds that could enhance or diminish development.<sup>21</sup>

The results obtained showed that bovine embryo culture in medium containing ITS and BOEC had the higher percentages of blastocyst development, when compared with the control; however those cultured in

con células se prepararon gotas de 100 ml, para la incubación de los huevos. Cada 48 horas se realizó el cambio del 50% del medio por medio TCM + BOEC fresco. c) TCM-ITS. Medio de cultivo testigo, conteniendo además 5 mg/ml insulina; 5 mg/ml transferrina; 5 mg/ml de selenito de sodio (ITS, Sigma # 1884). Con este medio se prepararon gotas de 100 ml en placas de cultivo Falcon®, 3001.

Se compararon los resultados de los porcentajes de desarrollo embrionario, utilizando la prueba de diferencia entre proporciones. Además se utilizó la prueba de Bon Ferroni para determinar la existencia de diferencias significativas entre los medios.<sup>18</sup>

Los porcentajes de desarrollo embrionario se evaluaron al comienzo del cultivo, a las 24 horas y al sexto día de incubación en cada medio en estudio.

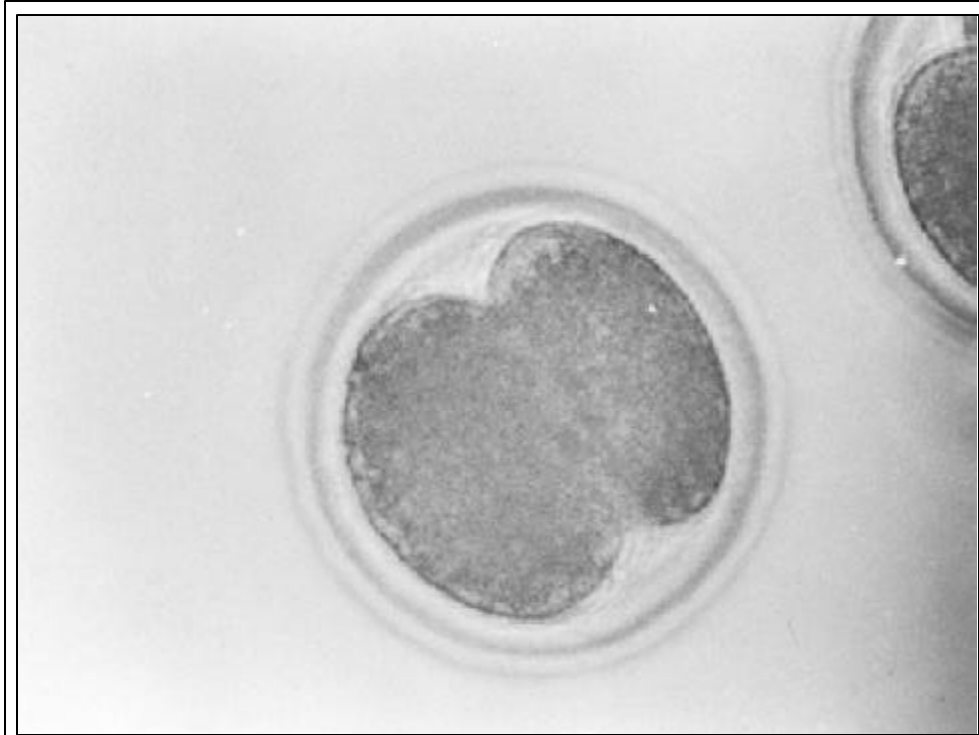
A las 24 horas de cultivo los huevos incubados en los tres medios no mostraron diferencias significativas en la primera división celular (estado de dos blastómeras) ( $P > 0.05$ ) (Figura 1A; Cuadro 1). El desarrollo al sexto día de incubación mostró que los huevos incubados en el medio de cultivo testigo (TCM-199 suplementado con BSA), obtuvieron un desarrollo inferior ( $P < 0.05$ ), al compararlo con los medios TCM-199 + BOEC y TCM-199 + ITS (Cuadro 1). El desarrollo preimplantacional en el medio testigo se detuvo principalmente al estado de dos blastómeras (Figura 1A), alcanzando el estado de blastocisto temprano sólo 1.7% de ellos. La suplementación del medio de cultivo con insulina, transferrina y selenito de sodio, permitió que un porcentaje mayor (20.3  $P < 0.05$ ) de ovocitos fecundados alcanzara el estado de blastocisto temprano (Figura 1B), al compararlo con el desarrollo alcanzado al usar el medio suplementado (BOEC, 12.3%).

No se observaron diferencias morfológicas (forma y tamaño celular) en las distintas etapas del desarrollo entre los embriones obtenidos con los distintos medios de cultivo analizados.

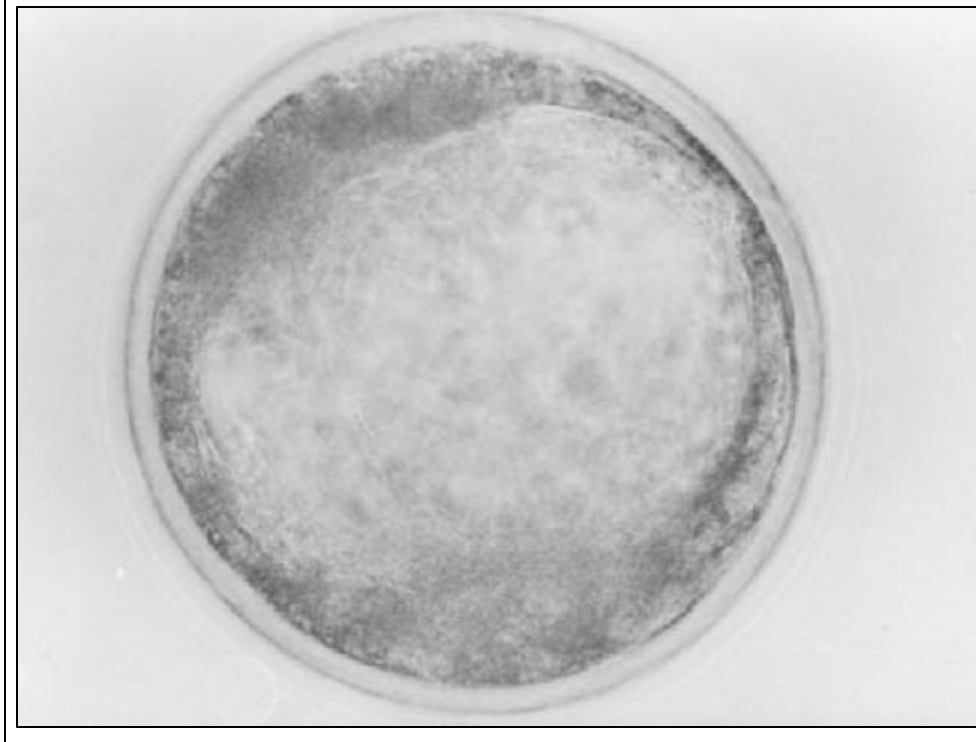
La adición de albúmina sérica a los medios de cultivo ayuda al desarrollo preimplantacional debido a sus propiedades protectoras contra componentes tóxicos en el medio, aportando, además, la suplementación tradicional de proteínas.<sup>6,19</sup> Cigotos de diferentes especies domésticas podrían alcanzar un desarrollo más avanzado en cultivos simples suplementados sólo con suero o albúmina sérica bovina.<sup>20</sup> Sin embargo, en este trabajo se observó que la sola adición de BSA al medio de cultivo (medio testigo) no fue suficiente para permitir el desarrollo hasta estados más avanzados del desarrollo, como lo demuestra el bajo porcentaje de blastocistos obtenidos en el medio testigo. Algunos estudios han confirmado que diferentes lotes de albúmina afectarían el desarrollo embrionario en algunas especies, incluida la bovina, ello podría estar relacionado con la presencia o ausencia de compuestos en las diferentes albúminas utilizadas, que podrían favorecer o inhibir este desarrollo.<sup>21</sup>

media containing ITS had a significant higher rate of development. Though it has been shown that the addition of oviductal cells or media conditioned to bovine embryo culture have quite a beneficial effect on development,<sup>3,4,11</sup> other investigations have not

Los resultados obtenidos, mostraron que el cocultivo de embriones bovinos fecundados in vitro, con células epiteliales oviductales (BOEC) o con insulina, transferrina y selenio (ITS), facilitaron el desarrollo a estados más avanzados, al compararlos con el medio testigo; sin em-



A)



B)

**Figura 1.** Diferentes estados del desarrollo embrionario preimplantacional bovino. A) Estado de dos células (24 horas de cultivo). B) Blastocisto temprano (seis días de cultivo).  
Different stages of preimplantational bovine embryo development. A) Two-cell stage (24 hours of culture) B) Early blastocist. (6 days of culture).



**Cuadro 1**  
**PORCENTAJE DE DESARROLLO EMBRIONARIO UTILIZANDO DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO**  
**PERCENTAGE OF EMBRYO DEVELOPMENT USING DIFFERENT CULTURE MEDIA**

Culture media	Two cell embryos (24 hours)		Early blastocysts (six days)	
	N	%	N	%
TCM + BOEC	125/283	44.1 <sup>a</sup>	35/283	12.3 <sup>a</sup>
TCM + ITS	120/281	43.0 <sup>a</sup>	57/281	20.3 <sup>b</sup>
TCM CONTROL	53/118	44.9 <sup>a</sup>	2/118	1.7 <sup>c</sup>

\* Values with different superscripts within the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

shown a clear and significant effect upon development.<sup>22</sup> These apparent differences could be associated with different contributions, both in terms of concentrations and quality, of oviductal cell factors such as of peptides, enzymes and embryotrophic factors.<sup>23-25</sup> The ill-defined medium composition when adding oviductal cells contrasts with the characteristics of a defined medium such as that of adding compounds such as ITS, where the former situation is brought about by the impracticality of identifying each component and concentration necessary for the culture medium.

Studies using macromolecular supplementation and growth factors<sup>25</sup> have shown that when TCM 199 is enriched with surfactant T-80 and ITS or EFG there is an increased rate of bovine morulae development. This is probably due to the important mytogenic activity of insulin.<sup>14</sup> Furthermore, it has also been shown that bovine embryos can incorporate maternal insulin through receptor-mediated endocytosis, thus insulin could stimulate DNA, RNA, protein and lipid synthesis, hence regulating cell functions.<sup>26</sup> Besides its iron transporting function, transferrin could also be working as a detoxifying molecule to remove toxic metals from the culture medium.<sup>9</sup> It is possible that the best result obtained in the present work could well be related to the addition of transferrin, which was potentiated by the addition of insulin and selenium (ITS).

Selenium could prevent the oxidative damage produced in cell cultures,<sup>16</sup> something that it is important to consider when culturing mammalian embryos with a high proportion of atmospheric oxygen (5% CO<sub>2</sub> in air), such as that used in these in vitro studies, that could induce mitochondrial damage due to the increase in free radicals.<sup>27</sup>

Embryos cultured with IGF, human transferrin and bovine insulin could improve development when

bargo, la proporción total de blastocistos tempranos que se obtuvo utilizando el medio con células del oviducto, fue significativamente inferior al obtenido con la adición de ITS, donde se agregaron cantidades definidas de insulina, transferrina y selenio. Aunque la adición de células oviductales o medio condicionado a los medios de cultivo embrionario bovino, ha probado ejercer un efecto benéfico para el desarrollo,<sup>3,4,11</sup> en otras investigaciones no se ha observado un efecto claro y significativo en el desarrollo.<sup>22</sup> Estas divergencias podrían estar asociadas a diferentes concentraciones en el medio de los diversos componentes involucrados en el desarrollo embrionario aportado por las células del oviducto, ya que además del efecto físico directo entre el embrión y las células oviductales, la principal forma en que el tejido oviductal ayudaría a sostener el desarrollo en las primeras etapas, estaría relacionada con la adición de péptidos, enzimas y factores embriotróficos en el medio.<sup>23-25</sup> No obstante, la modificación de las concentraciones de los constituyentes del medio empleado, dado por la adición de las células del oviducto, puede no ser siempre el adecuado, ya que en estos cultivos se hace impráctica la identificación de todos estos componentes como de sus concentraciones. Esto no sucedería al agregar cantidades previamente determinadas de factores que promoverían el crecimiento celular, como ocurriría con el ITS.

Trabajos con suplementación macromolecular y de factores del crecimiento,<sup>25</sup> muestran que la adición de ITS o EGF al medio TCM con surfactante T-80, aumenta la tasa de mórulas en cultivos embrionarios bovinos. La insulina ha probado ejercer una actividad mitogénica importante,<sup>14</sup> además se ha demostrado que los embriones internalizan insulina materna a través de endocitosis mediada por receptores, la insulina ejercería su acción mediante la estimulación de la síntesis de ADN, ARN, proteínas y lípidos, regulando las funciones celulares.<sup>26</sup> La transferrina, además de unir fierro

cultures are started at the 8-celled morula stage. On the other hand, it has also been said that the mRNA transcription for many growth factors and their receptors are synthesized in bovine and ovine embryos in different stages of their development. In the present study we found that during the first hours of development there were no significant differences up to the first cleavage stage, thus confirming findings from other studies,<sup>23</sup> thus suggesting the beneficial effect after the addition of embryotrophic factors could be between the 8- and 16-celled stage, when embryonic genome assumes the control of development.<sup>7</sup> Therefore in vitro fertilized bovine oocytes reaching the two or four celled stage could not be a good indicator to estimate their true potential for development.

Considering the many difficulties encountered when trying to culture bovine embryos in media containing somatic cells, due mainly to the difficulty in standardizing their components, as well as their inefficient maintenance and the risk factor of their acting as vectors for disease, it seems necessary to obtain normal embryos under chemically-defined culture media.

## Acknowledgments

This paper was financed by FONDECYT and FIV-3633 research projects, Faculty of Veterinarian Sciences, University of Chile.

## Referencias

1. Maeda J, Kotsuji F, Nagami A, Kamitani N, Tominaga T. In vitro development of bovine embryos in conditioned media from bovine granulosa cells and vero cells cultured in exogenous protein and amino acid-free chemically defined human tubal fluid medium. *Biol Reprod* 1996;54:930-936.
2. Aoyagi Y, Fukui I, Iwazumi Y, Urakawa M, Minegishi Y, Ono H. Effects of culture system on development of in vitro-fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology* 1989;31:168. (Abstr)
3. Eyestone W, First N. Coculture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fertil* 1989;85:715-720.
4. Kamishita H, Takagi M, Choi Y, Wijayagunawardane MP, Miyazawa K, Sato K. Development of in vitro-matured and fertilized bovine embryos cocultured with bovine oviductal epithelial cells obtained from oviducts ipsilateral to cystic follicles. *Anim Reprod Sci* 1999;56:201-209.
5. Abe H, Sendai Y, Satoh T, Hoshi IH. Bovine oviduct-specific glycoprotein: A potent factor maintenance of viability and motility of bovine spermatozoa in vitro. *Mol Reprod Dev* 1995;42:226-232.
6. Thompson JG. Defining the requirements for the bovine embryo culture. *Theriogenology* 1996;45:27-40.
7. Kobayashi K, Tagaki Y, Satoh T, Hoshi H, Oikawa T. Development of early bovine embryos to the blastocyst

para transporte celular, podría actuar también como una proteína detoxificante mediante la remoción de metales tóxicos al medio.<sup>9</sup> Es probable que el efecto más significativo observado en el presente estudio al agregar transferrina, haya estado potenciado por la adición además de insulina y selenio (ITS).

El selenio prevendría el daño oxidativo en cultivos celulares,<sup>16</sup> esto es importante de considerar en los cultivos de estados preimplantacionales con una alta proporción de oxígeno atmosférico (5% CO<sub>2</sub> en aire), como el utilizado usualmente en estos ensayos in vitro, provocando daño a nivel mitocondrial al aumentar los radicales libres.<sup>27</sup>

Embriones cultivados con IGF, transferrina humana e insulina bovina, mejorarían el desarrollo embrionario a partir de mórulas al estado de ocho células. Por otra parte, también se ha descrito que la transcripción de ARN-m para muchos factores de crecimiento y sus receptores se producen en embriones bovinos y ovinos en diferentes etapas del desarrollo. En este estudio no se observó durante las primeras horas de cultivo el efecto benéfico de sustancias promotoras del desarrollo preimplantacional, ya que no hubo diferencias significativas en la primera segmentación al utilizar cualquiera de los tres medios estudiados, lo que confirma estudios anteriores,<sup>23</sup> señalando que el mayor efecto positivo de la suplementación con factores embriotróficos ocurriría después del bloqueo en el desarrollo, que en los bovinos es entre las ocho y 16 blastómeras, cuando el genoma embrionario asume el control del crecimiento.<sup>7</sup> Por tanto, la capacidad de ovocitos bovinos fecundados in vitro de alcanzar la etapa de dos o cuatro células no sería un indicador que permita una estimación adecuada de un desarrollo preimplantacional.

Considerando las dificultades que involucran los sistemas de cocultivo de embriones con células somáticas por el principal problema en estandarizar sus componentes, como también la ineficiencia en mantenerlos y el posible riesgo de que puedan servir como vectores de algunas enfermedades, se hace necesario la obtención de embriones preimplantacionales normales bajo condiciones in vitro definidas.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado en parte proyecto FONDECYT y FIV, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

stage in serum-free conditioned medium from bovine granulosa cells. *In vitro Cell Dev Biol* 1992;28:255-259.

8. McKeehan WL, Hamilton WG, Ham RG. Selenium is an essential trace nutrient for growth of WI-38 diploid human fibroblasts. *Proc Nat Acad Sci USA* 1979;73:2023-2027.

9. Barnes D, Sato G. Methods for growth of cultured cells in serum medium. *Anal Biochem* 1980;102:255-270.
10. Zhang X, Armstrong T. Presence of amino acids and insulin in a chemically defined medium improves development of 8-cell rat embryos in vitro and subsequent implantation in vivo. *Biol Reprod* 1990;42:662-668.
11. Ellington JE, Farrell PB, Foote R. Comparison of six-day bovine embryo development in uterine tube (oviduct) epithelial cell co-culture versus in vivo development in the cow. *Theriogenology* 1990;34:837-844.
12. Shamsuddin M. In vitro fertilization in the bovine: oocyte maturation, fertilization and early embryonic development (Doctoral Thesis) Uppsala, Sweden: Faculty of Veterinary Medicine. Swedish University of Agricultural Sciences, 1993.
13. Seidel GE, Nauta W, Olson SE. Effects of myositol, transferrin and insulin on culture of bovine embryos. *J Anim Sci* 1994;69 (Suppl 1):403 (Abstr).
14. Herrler A, Lucas-Hahn A, Niemann H. Effects of insulin-like growth factor-I on in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology* 1992;37:1213-1224.
15. Ekblom P. Basement membrane proteins and growth factors in kidney differentiation. In: Trelstad, RL, The role of extracellular matrix in development. Liss A.R, New York; 1984:173-206.
16. Gronbaek H, Frystyk J, Orskov H, Flyvbjerg A. Effect of sodium selenite on growth, insulin-like growth factor-binding proteins and insulin-like growth factor in rats. *J Androl* 1995;145:105-112.
17. De los Reyes M, Barros C. Immunolocalization of Proacrosin/Acrosin in bovines and bovine sperm penetration through the zona pellucida. *Anim Reprod Sci* 2000;58:215-228.
18. Sokal R, Rohlf J. *Biometry*. 2<sup>nd</sup> ed. San Francisco, Freeman (W.H) and Co. 1981.
19. Wang S, Liu Y, Holyoak GR, Bunch TD. The effect of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre and post-cleavage-stage bovine embryos cultured in modified CR2 and M199 media. *Anim Reprod Sci* 1997;48:37-45.
20. Walker SK, Heard TM, Seamark RF. In vitro culture of sheep embryos without co-culture: Successes and perspectives. *Theriogenology* 1992;37:111-125.
21. Rorie RW, Miller GF, Nasti KB, Mcnew RW. In vitro development of bovine embryos as affected by different lots of albumin and citrate. *Theriogenology* 1994;40:397-403.
22. Gliedt DW, Rosenkrans CF, Rorie RW, Munyon AL, Pierson JN, Miller GF, Rakes JM. Effects of media, serum, oviductal cells and hormones during maturation on bovine embryo development in vitro. *J Dairy Sci* 1995;79:539-542.
23. Pawevasuthipaisit K, Lhuangmahomongkl S, Tocharus C, Kitiyanant Y, Prempre P. Porcine oviductal cells support in vitro bovine embryo development. *Theriogenology* 1994;41:1127-1138.
24. Bavister BD. Interactions between embryos and the culture milieu. *Theriogenology* 2000;53:619-626.
25. Palasz AT, Thundathil J, Verral RE, Mapletoft RJ. The effect of macromolecular supplementation on surface tension of TCM-199 and the utilization of growth factors by bovine oocytes and embryos in culture. *Animal Reprod Sci* 2000;58:229-240.
26. Vedeler A, Pryme LF, Hesketh JE. Insulin induces changes in the sub cellular distribution of actin and S-nucleotidase. *Mol Cell Biochem* 1991;108:67-74.
27. Kruij TA, Bevers MM, Kemp B. Environment of oocytes and embryo determines health of IVP offspring. *Theriogenology* 2000;53:611-618.