

# EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON L-CISTEÍNA EN LA MADURACIÓN *in vitro* DE OVOCITOS BOVINOS

## L-Cysteine Supplementation Effect on the *in vitro* Maturation of Bovine Oocytes

Adirno Hernández-Fernández<sup>1</sup> y Hugo Hernández-Fonseca<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Universidad Nacional Experimental Sur del Lago (UNESUR).

<sup>2</sup> Laboratorio de Fecundación In Vitro, Unidad de Investigación en Biotecnología Animal (UNIBIO).

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia (LUZ). \*hugo.hernandez@fcv.luz.edu.ve, hernandezad@unesur.edu.ve

### RESUMEN

La fecundación *in vitro* (FIV) es en la actualidad una biotecnología de rutina en gran número de laboratorios de investigación a escala mundial, utilizada como herramienta para el estudio de diversos aspectos relacionados con la maduración de ovocitos, la fecundación y el desarrollo temprano del embrión en condiciones *in vitro*. La L-cisteína es un sustrato externo requerido para la síntesis del glutatión en la maduración de ovocitos bovinos. Con el objetivo de evaluar el efecto de la suplementación con L-cisteína sobre la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos, se llevó a cabo un experimento con ovarios obtenidos de vacas mestizas beneficiadas en una sala de matanza local. Se utilizaron tres tratamientos con diferentes concentraciones T1: 0 mM; T2: 0,1 mM y T3: 1,0 mM. Aproximadamente 400 Complejos Cumulus Ovocito (COCs) por tratamiento se maduraron en pozos de 500 µL del medio de maduración (TCM-199), distribuyéndose 50 COC por pozo en una incubadora a 5% de CO<sub>2</sub>, a 38,5°C y con humedad saturada. Los datos se analizaron por medio de un análisis de varianza (ANAVAR). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en el porcentaje de ovocitos que llegaron a Metafase II (MII, T1: 72,77%, T2: 67,47% y T3: 70,43%). Los resultados indican que la suplementación con L-cisteína durante la maduración no ejerció un efecto sobre el porcentaje de ovocitos bovinos que alcanzaron el estado de MII, sin embargo se deben realizar otras investigaciones para determinar el efecto ulterior que tiene la L-cisteína adicionada en la maduración sobre la fecundación y el desarrollo embrionario *in vitro*.

**Palabras clave:** MIV, bovino, L-cisteína, ovocito.

### ABSTRACT

*In vitro* fertilization (IVF) is now a routine technique in a number of biotechnology research laboratories worldwide. IVF is used as a tool for the study of various aspects related to oocytes maturation, fertilization and early embryo development. L-cysteine constitutes an external substrate required for synthesis of glutathione in the maturation of cattle oocytes. In order to study the effect of L-cysteine supplementation on *in vitro* maturation of cattle oocytes, ovaries were obtained from crossbred cows culled at a local slaughterhouse. Three different *in vitro* maturation treatments were utilized. Each treatment had a different concentrations of L-cysteine: T1: 0 mM, T2: 0.1 mM and T3: 1.0 mM. Approximately 400 Cumulus Oocyte Complexes (COCs) were matured in wells of 500 µL of maturation medium (TCM-199), with 5% CO<sub>2</sub> at 38.5°C and saturated relative humidity. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA). There were no significant differences between treatments in term of oocytes that arrived to Metafase II (MII, T1: 72.77%, T2: 67.47% and T3: 70.43%). Results indicate that supplementation with L-cysteine during maturation did not positively affect the percentage of bovine oocytes that reached the M II state. Nonetheless further research should be carried out to determine the effect of L-cysteine supplementation during maturation, on fertilization and on embryonic development *in vitro*.

**Key words:** IVM, bovine, L-cysteine, oocyte.

### INTRODUCCIÓN

Los rebaños bovinos (*Bos taurus-indicus*) de doble propósito en Venezuela y en América Tropical, constituyen el soporte más importante de la actividad ganadera [15]. En el caso venezolano existe una marcada disminución del rebaño nacio-

nal, de casi trece millones de cabezas que existían en el año 1998, a once millones y medio para el año 2002 y una baja productividad de dichos animales [15]. Por lo tanto, es una tarea prioritaria mejorar el comportamiento productivo y reproductivo de los bovinos de doble propósito, así como incrementar el número de vientres, si se quiere cubrir la demanda nacional de proteína bovina, que asciende a unos 1.800 millones de litros de leche y a más de 3.000.000 kg de carne al año [15].

En las últimas décadas, el estudio de la reproducción en el ganado bovino ha evolucionado de manera acelerada, marcando el inicio de una nueva etapa. Ésta se caracteriza por el desarrollo de una serie de biotecnologías que contribuirán a aumentar, en forma rápida, la capacidad reproductiva y el mejoramiento genético del ganado bovino [19].

La fecundación *in vitro* (FIV) es en la actualidad una biotecnología de rutina en un gran número de laboratorios de investigación a escala mundial, utilizada como herramienta para el estudio de diversos aspectos relacionados con la maduración de ovocitos, la fecundación y el desarrollo temprano del embrión en condiciones *in vitro*. En estos laboratorios, los porcentajes de segmentación y posterior desarrollo embrionario (tasa de formación de blastocistos) a partir de ovocitos (80% y hasta un 40%, respectivamente) son importantes y muestran el gran potencial de la técnica [19].

Es posible obtener ovocitos para la producción de embriones *in vitro* provenientes de: a) vacas que no responden al tratamiento de superovulación; b) vacas enfermas o que han muerto recientemente; c) vacas preñadas durante el primer trimestre de la gestación; d) vacas durante el postparto temprano; e) ovarios de vacas de matadero; f) ovocitos de terneras pre-púberes; g) colección de vacas que responden a tratamientos de súper estimulación, pero que por fallas en la fecundación o por problemas uterinos no han producido embriones; h) vacas con quistes ováricos u obstrucción de oviductos; i) vacas con anomalías uterinas o con adherencias ováricas [19].

La FIV involucra tres fases secuenciales: la maduración de ovocitos, la fecundación *in vitro* propiamente dicha y el cultivo *in vitro*. La maduración citoplasmática de ovocitos involucra eventos moleculares que incluyen la síntesis y fosforilación de proteínas y activación de vías metabólicas particulares [12, 20], cambios esenciales para la fecundación y el desarrollo embrionario normal.

Durante el cultivo *in vitro* de gametos y embriones se produce gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), en comparación con las encontradas en el tracto reproductivo de la hembra (*in vivo*) [14]. Además, dado que los gametos (ovocitos y espermatozoides) tienen comprometida la capacidad para eliminar las ROS, el acúmulo de éstos en condiciones *in vivo*, provoca daños a nivel mitocondrial de los ácidos nucleicos y las proteínas [14, 18, 21, 31, 35].

El incremento del estrés oxidativo es responsable de numerosos tipos de daños al embrión. Las especies reactivas de oxígeno tales como  $O_2^-$  difunden y pasan a través de la membrana celular y alteran muchos tipos de moléculas celulares, tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Las consecuencias son múltiples e incluyen alteraciones mitocondriales, bloqueo de las células del embrión, depleción del ATP y apoptosis [11, 18]. La modificación oxidativa de los componentes celulares vía especies reactivas por el oxígeno (estrés oxidativo), es uno de los potentes procesos más dañinos para la función celular. En muchas células, los sistemas antioxidantes eficientes pueden atenuar el efecto del estrés oxidativo en contra de las especies reactivas por el oxígeno [11].

Por las alteraciones mencionadas anteriormente, rutinariamente se incluyen en los medios de cultivo sustancias antioxidantes, tales como las enzimas superóxido dismutasas y catalasa o aminoácidos involucrados en la síntesis de glutatión (GSH), que es el antioxidante natural encontrado en las células de mamíferos [1, 33]. La síntesis de glutatión reducido (GSH) durante la maduración de ovocitos *in vitro* ha sido reportado en ratones (*Mus musculus*) [5], hamster (*Cricetus cricetus*) [27], cerdos (*Sus scrofa domestica*) [34] y bovinos (*Bos taurus, indicus*) [25]. Durante el desarrollo y la maduración de los ovocitos en el ovario, el contenido de GSH se incrementa [28] y esta acumulación intracelular de GSH en el ovocito, favorece positivamente la fecundación y ulterior desarrollo embrionario [10].

Las concentraciones de cisteína en los medios de maduración basados en TCM-199 (issue Cultura Media 199), usado como rutina en la MIV de ovocitos bovinos son muy bajas (0,6 M) comparadas con la concentración de cistina (83,2 M), y debido a la autooxidación de la cisteína a cistina [9], los niveles de este aminoácido en el medio es inexistente.

La síntesis de GSH prácticamente depende de la disponibilidad de cisteína en el medio [26, 29, 32]. Sin embargo, la cisteína se oxida fácilmente, formando la cistina, un dímero de la cisteína, incluso bajo las condiciones de cultivo más usuales [29]. Cuando la cisteína se oxida a cistina bajo condiciones de cultivo, algunos tipos de células, como los linfocitos, tienen dificultad para utilizar la cistina, resultando en una disminución en la proliferación de los linfocitos y concentración intracelular de GSH [32]. Uno de los papeles más importantes del GSH es mantener el estado redox, actuando como tampones metabólicos pudiendo atenuar el estrés oxidativo, mediante la eliminación de agentes oxidantes en la célula protegiéndola de los efectos causados por el daño oxidativo.

La adición de cisteína, un aminoácido que puede ser metabolizado por las células durante la MIV y el CIV, mejora la tasa de desarrollo de embriones [1]. Además, tanto el  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) como la L-cisteína, promueven incremento en la tasa de formación de blastocistos en un sistema de cultivo químicamente definido (22,0%  $\pm$  2,1 contra 16,2%  $\pm$  1,8 cuando se le agregó L-cisteína y 23,3%  $\pm$  2,2 contra 10,7%  $\pm$

1,6 cuando se le agregó al medio  $\beta$ -ME) [3]. La suplementación con  $\beta$ -mercaptoetanol, cisteína y cistina durante la maduración *in vitro*, incrementa el contenido intracelular de GSH en ovocitos bovinos y mejora la calidad del mismo [1, 2, 7-9, 17].

Aunque el mecanismo que promueve el efecto de la cisteína o la cisteamina sobre la síntesis de GSH en ovocitos no está claramente dilucidado, se ha demostrado que los complejos cumulus-ovocitos pueden utilizar, tanto cistina como cisteína para la síntesis de GSH, más efectivamente que los complejos desnudos (DOs). Además, la cisteína puede penetrar las células embrionarias y aglomerar los desechos de las especies reactivas de oxígeno [3, 16, 23] incrementando las concentraciones intracelulares de GSH de ovocitos que progresan de vesícula germinal al estado de Metafase II [4, 13]. Esto último conlleva a una disminución del nivel de peróxido de hidrógeno intracelular y a un buen desarrollo embrionario, como lo demostró el estudio de Ali y col. [1]. Basados en la literatura citada, este estudio fue realizado con el fin de evaluar el efecto de la suplementación con L-cisteína sobre la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los complejos cumulus-ovocito (COCs) fueron obtenidos de ovarios de vacas mestizas beneficiadas en una sala de manzanera local y transportados en un termo (Friotermino, Potamito, Venezuela) en solución salina fisiológica al 0,9% de NaCl entre 25 y 30°C hasta el laboratorio. Posteriormente, 2 a 3 horas después de colectados, los ovarios fueron lavados dos a tres veces en solución salina fisiológica hasta eliminar la mayor cantidad de sangre y contaminantes.

Los folículos de 2-10 mm de diámetro fueron aspirados de la superficie ovárica con una aguja hipodérmica de 1½ pulgadas de 18G conectada a una jeringa de 12 mL. El fluido folicular aspirado fue depositado en tubo de ensayo plástico estéril protegido de la luz. Una vez aspirados todos los folículos visibles, se dejó que los ovocitos precipitaran al fondo del tubo (aproximadamente 10 min) y se desechó el tercio superior del sobrenadante. Se realizó un primer lavado del fondo, donde se encuentran los ovocitos con medio de lavado (solución salina buferada), se homogenizó bien y se repartió en placas de 60 mm (platina calentadora, Modelo 2602075, Fisher Scientific) a 38,5°C para proceder a la búsqueda y selección de los COCs.

Bajo la lupa estereoscópica (Modelo SZ51, Olympus, Japón) se seleccionaron sólo los COCs morfológicamente más aptos para ser madurados *in vitro*. Se escogieron COCs con citoplasma homogéneo, con zona pelúcida (ZP) intacta y rodeados completamente por 3 o más capas compactas de células del cumulus [22]. Los COCs seleccionados fueron lavados tres veces con solución salina buferada y otras tres veces con el medio de maduración ovocitaria (OMM) cuya base es TCM-199 suplementado con L-glutamina (0,25 mM), piruvato de sodio (50  $\mu$ g/mL), 10% de suero fetal bovino, estradiol ( $E_2$ ,

2  $\mu$ L/mL), hormona foliculo estimulante (FSH, 1  $\mu$ L/mL) y factor de crecimiento epidérmico (EGF, 10  $\mu$ L/mL).

Los COCs, aproximadamente 400 por tratamiento, se distribuyeron en número de unos 50 COCs por cada pozo de 500  $\mu$ L. A cada grupo de ovocitos se le adicionó la dosis de L-cisteína correspondiente, de acuerdo al tratamiento aleatoriamente asignado (TABLA I) y se cultivó en un incubador de CO<sub>2</sub> a 38,5°C, en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y en aire saturado de humedad. Transcurridas las 24 horas de maduración, los ovocitos fueron fijados en aceto-etanol (ácido acético/etanol, 1:3 v/v), teñidos con 1% de aceto-orceína (Sigma, 07380) y examinados bajo el microscopio de contraste de fase (Modelo CX31, Olympus, Japón) con el fin de cuantificar la proporción de ovocitos en MII.

## Análisis estadístico

Los datos se analizaron por medio de un análisis de varianza (ANAVAR), las variables porcentuales (MII: ovocitos en metafase II; MI: ovocitos en metafase I y DEG: ovocitos degenerados), mediante un análisis de regresión logística a través del paquete estadístico SAS [30].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la TABLA II se muestran los valores obtenidos de ovocitos madurados *in vitro* suplementados con L-cisteína, en estado de metafase II + corpúsculo polar (FIGS. 1 y 2), en estado de metafase I y ovocitos degenerados, no observándose diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre los tratamientos probados (0 mM L-cisteína, 0,1 mM L-cisteína y 1,0 mM L-cisteína).

En la FIG. 3 puede observarse que, a pesar de no encontrarse diferencias significativas entre los tres tratamientos, se puede confirmar que la maduración ovocitaria al estado de MII, es el evento predominante luego del retiro del ovocito del ambiente folicular [25].

Bajo las condiciones de incubación y las concentraciones de L-cisteína utilizadas en este estudio, se ha demostrado que no hubo un efecto significativo de la suplementación con L-cisteína durante la maduración *in vitro* de ovocitos. Contrario a los resultados obtenidos en este estudio, donde no se observó ningún efecto sobre la maduración *in vitro*, algunos investigadores han reportado efectos beneficiosos sobre el desarrollo de embriones producidos *in vitro*, después de la adición al medio de un suplemento de tioles de bajo peso molecular [3, 23]. Esto sugiere que un alto contenido intracelular de GSH en ovocitos en MII podría ser un potencial reservorio de este antioxidante que puede ser utilizado por los ovocitos para su desarrollo posterior. La adición de compuestos tioles, como la cisteína, promueve un aumento de GSH simultáneamente con la progresión de la maduración meiótica. El aumento de las concentraciones intracelulares de GSH durante la reanudación de la meiosis es mayor en ovocitos en etapa de Anafase I y

**TABLA I**  
**NIVELES DE TRATAMIENTO CON L-CISTEÍNA**  
**SUPLEMENTADAS EN EL MEDIO DE MADURACIÓN**  
**IN VITRO / LEVELS OF TREATMENT WITH L-CYSTEINE**  
**SUPPLEMENTS IN THE IN VITRO MATURATION MEDIUM**

Tratamiento	Concentraciones de L-cisteína utilizadas en el medio de maduración <i>in vitro</i>
1	0 mM de L-cisteína (control)
2	0,1 mM de L-cisteína
3	1,0 mM de L-cisteína

Metafase II (MII) en comparación con aquellos que eran inmaduros [6].

Recientemente, estudios han reportado [24] que, la adición de cisteína en el MIV no asegura un aumento en la maduración nuclear o en la fecundación, lo cual se ve reforzado por los datos reportados en este estudio. Sin embargo, más estudios son requeridos para dilucidar exactamente sobre que condiciones *in vitro*, la cisteína puede provocar efectos beneficiosos al proceso de maduración ovocitaria. La concentración de GSH, por su papel funcional durante el periodo de maduración y el desarrollo embrionario, puede ser considerado un marcador bioquímico de la maduración citoplasmática de ovocitos en gato (*Felis catus domesticus*), cerdo, vaca y ovejas [34], Por lo que la medición de GSH intracitoplasmático sería un elemento recomendado para próximos estudios.

**CONCLUSIONES**

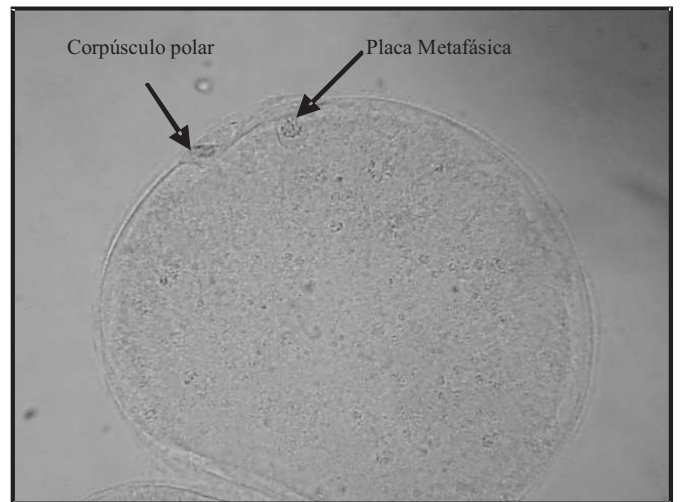
Los resultados indican que la suplementación con L-cisteína a las concentraciones utilizadas y bajo las condiciones de MIV aplicadas en este estudio no ejercieron un efecto positivo sobre el porcentaje de ovocitos bovinos que alcanzaron el estado de metafase II (maduración nuclear).

**RECOMENDACIONES**

Se recomienda continuar otras investigaciones sobre el efecto que tiene un aminoácido como la L-cisteína, actuando como antioxidante cuando es utilizado en el medio de madura-



**FIGURA 1. OVOCITO EN ESTADO DE METAFASE II (TINCION CON ACETO-ORCEINA AL 1%) / OVOCYTE IN METAPHASE II (SATINED DWITH ACETO-ORCEINE 1%).**

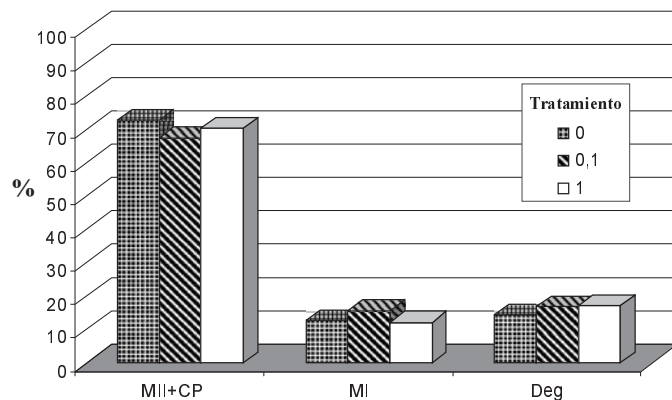


**FIGURA 2. OVOCITO EN ESTADO DE METAFASE II, SE OBSERVA DETALLES DEL CORPÚSCULO POLAR (TINCION CON ACETO-ORCEINA AL 1%) / OVOCYTE IN METAPHASE II (SATINED DWITH ACETO-ORCEINE 1%).**

**TABLA II**  
**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON L-CISTEÍNA SOBRE LA MADURACIÓN IN VITRO / EFFECT OF L-CYSTEINE**  
**SUPPLEMENTACION ON IN VITRO MATURATION**

Tratamiento	Repeticiones	n	MII (%)	MI (%)	DEG (%)
0 L-cisteína	10	393	286/393 (72,77) ns	50/393 (12,72) ns	57/393 (14,50) ns
0,1 L-cisteína	10	415	280/415 (67,47) ns	65/415 (15,66) ns	70/415 (16,87) ns
1,0 L-cisteína	10	416	293/416 (70,43) ns	51/416 (12,26) ns	72/416 (17,31) ns

ns: No significativo; P > 0,005. n: número de observaciones. MII: Metafase II. MI: Metafase I. DEG: Degenerados.



**FIGURA 3. PORCENTAJES DE OVOCITOS EN METAFASE II (MII+CP), METAFASE I (MI) Y DEGENERADOS (DEG) / RATE OF METAPHASE II (MII+CP), METAPHASE I (MI) AND DEGENERATED (DEG) OVOCYTES.**

ción sobre la fecundación y el desarrollo embrionario, no sólo en la maduración nuclear, si no también en la maduración citoplasmática. Se recomienda la medición de los niveles de glutatión intracelular al final del proceso de maduración como indicativo de maduración citoplasmática. Así mismo, no se puede descartar la utilización de rangos más amplios de concentraciones en el medio de maduración.

### AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia (Proyecto CC-0716-05 y al laboratorio de Fecundación *in vitro* de la Unidad de Investigación en Biotecnología Animal (UNIBIO), de la Facultad de Ciencias Veterinarias, por el soporte financiero y apoyo logístico para el desarrollo de esta investigación.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ALI, AA; BILODEAU, JF; SIRARD, MA. Antioxidant requirement for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenol.** 59:939-949.2003.

[2] BALASUBRAMANIAN, S; GYU-JIN, R. Effect of cysteamine supplementation of *in vitro* matured bovine oocyte on chilling sensitivity and development of embryos. **Anim. Reprod. Sci.** 98:282-292. 2007.

[3] CAAMAÑO, JN; RYOO, ZY; THOMAS, JA; YOUNGS, CR.  $\beta$ -Mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine *in vitro*-matured/*in vitro*-fertilized embryos. **Biol. Reprod.** 57:1179-1184.1996.

[4] CAAMAÑO, JN; RYOO, ZY; YOUNGS, CR. Promotion of development of bovine embryos produced *in vitro* by addition of cysteine and  $\beta$ -Mercaptoethanol to a chemically defined culture system. **J. Dairy Sci.** 81:396-374. 1998.

[5] CALVIN, HI; GROSSHANS, K; BLAKE, EJ. Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova: Relevant to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. **Gamete Res.** 14:265-275.1986.

[6] COMIZZOLI, P; WILDT, DE; PUKAZHENTHI, BS. Overcoming poor *in vitro* nuclear maturation and developmental competence of domestic cat oocytes during the non-breeding season. **Reprod.**126:809-16. 2003.

[7] DE MATOS, DG; FURNUS, CC; MOSES, DF; BALDASSARRE, H. Effect of cysteamine on glutathione levels and development capacity of bovine matured *in vitro*. **Mol. Reprod. Dev.** 42:432-436. 1995.

[8] DE MATOS, DG; FURNUS, CC; MOSES, DF; MARTINEZ, AG; MATKORE, M. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryos development and freezability. **Mol. Reprod. Dev.** 45:451-457. 1996.

[9] DE MATOS, DG; FURNUS, CC; MOSES, DF. Glutathione sintesis during *in-vitro* maturation of bovine oocytes: Role of cumulus cells. **Biol. Reprod.** 57:1420-1425. 1997.

[10] DE MATOS, DG; FURNUS, C. The important of having high glutathione level alter bovine *in Vitro* maturation on embryo development: Effect of  $\beta$ -Mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenol.** 53(3):761-770. 2000.

[11] DE MATOS, DG; GASPARRINI, B; PASQUALINI, S; THOMPSON, J. Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryos development and intracellular peroxide content. **Theriogenol.** 57:1443-1451. 2002

[12] DEL CORSO, A; CAPPIELLO, M; MURA, U. Thiol-dependent oxidation of enzymes: The last chance against oxidative stress. **Int. J. Biochem.** 26:745-756. 1994.

[13] EPPIG, J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. **Reprod. Fétil. Dev.** 8:485-489.1996.

[14] FISCHER, B; BAVISTES, B.D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamster and rabbits. **J. Reprod. Fertil.** 99: 673-679.1993.

[15] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Report of the food and agriculture organization of the United Nations (FAO) on measures taken to assist the preparation and implementation of action programmers in all regions under the Convention to Combat Desertification (CCD) March 23, 2002.

[16] FUNAHASHI, H; STUMPF, TT; CANTELY, TC; KIN, NH; DAY, BN. Pronuclear formation and intracellular glutathione content f *in Vitro* matured porcine oocytes fol-

- lowing in Vitro fertilization and/or electrical activation. **Zygote**. 3:273-281. 1995.
- [17] GASPARRINI, B.; SAYOUD, H.; NEGLIA, G.; DE MATOS, D.G.; DONNAY, I.; ZICARELLI, L. Glutathione synthesis during in vitro maturation on buffalo (*Bubalus bubalis*) oocyte: effects of cysteamine on embryo development. **Theriogenol**. 60: 943-952.2003.
- [18] GUERIN, P.; MOVATASSIM, S.; MENEZO, EL.Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Hum. Reprod. Update**. 7:175-189, 2001.
- [19] HERNÁNDEZ-FONSECA, H. Fertilización *In Vitro*. En: **Reproducción Bovina**. C. Gonzalez-Stagnaro (Ed). Fundación Girarz, Maracaibo-Venezuela. Cap. XXVI. 171-186 pp. 2001.
- [20] ISHII, T; BANNAI, S; SUGITA, Y. Mechanism of growth stimulation of L1210 cell by 2-mercaptoethanol in vitro. **J. Biol. Chem**. 256:12387-12392.1981.
- [21] KITAGAWA, Y.; SUZUKI, K.; YOMEDA, A.; WATANABE, T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. **Theriogenol**. 62:1187-1197. 2004.
- [22] LE GUIENNE, B. **Petit atlas de l'ovocyte bovin**. Eleveage et insemination 288, Union Nationale des Cooperatives Agricoles d'Eleveage et d'insemination Artificielle Paris cedex 12.1998.
- [23] LIM, JM; LIUOI, SS; HANSEL, W. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of  $\beta$ -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. **Theriogenol**. 46:429-439.1996.
- [24] LUVONI, G; CHIGIONI, S. Culture strategies for maturation of carnivore oocytes **Theriogenol**. 66:1471-1475. 2006.
- [25] MIYAMURA, M; YOSIDA, M; HAMANO, S; KUWAYAMA, M. Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. **Theriogenol**. 43:282. 1995.
- [26] LUVONI, GC; KESKISTEPE, L; BRACKETT, BG. Improvement of bovine embryos production *in vitro* by glutathione-containing médium. **Mol. Reprod. Dev**. 43:437-443.1996.
- [27] PALMA, G. Producción *In Vitro* de embriones bovinos. **Biotecnología de la Reproducción**. Edit. INTA. 225-289 pp.2001.
- [28] PERREAULT, SD; BARBEE, RR; SLOTT, VI. Important of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nucleus decondensing activity in maturing hamster oocyte. **Dev. Biol**. 125:181-186. 1988.
- [29] SAGARA, J; MIURA, K; BANNAI, S. Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension. **J. Neurochem**, 61:1667-1671.1993.
- [30] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. User's Guide. Cary. N. C. USA, 2000.
- [31] TAKAHASHI, M.; KEICHO, K.; TAKAHASHI, H., OGAWA, H.; SCHULTH, R.M.; OKANO, A. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in *in-vitro* cultured bovine embryos by comet assay. **Theriogenol**. 54:137-145.2000.
- [32] TAKAHASHI, M; NAGAI, T; OKAMURA, N; TAKAHASHI, H; OKANO, A. Promoting effect of  $\beta$ -Mercaptoethanol on *in vitro* development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. **Biol. of Reprod**. 6:562-567. 2002.
- [33] WAYHER, D.D.M.; BURTON, G.W. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical trapping antioxidant activity of human blood plasma. **Biochim. Biophys. Acta**. 924:408-410.1987.
- [34] YOSHIDA, M; ISHIGAKI, K; NAGAI, T; CHIKYU, M; PURSEL, VG. Glutathione concentration during maturation end alters fertilization in pig oocyte: Relevant to the ability of oocytes to form male pronucleus. **Biol. Reprod**. 49:89-94.1993.
- [35] YUAN, Y.Q.; VAN SOOM, A.; COOPMAN, F.O.J.; MINTIENS, K.; BOERJAN, M.L.; VAN ZEVEREN, A.; DE KRUIF, A.; POELMAN, L.J. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. **Theriogenol**. 59:1585-1596. 2003.