

Segunda Etapa del Programa El Bebé Probeta en Ganadería (Producción *in vitro* de embriones)

Dr. Héctor Palomino M.*

En el desarrollo de la ganadería en el mundo, cada vez adquiere mayor importancia la reproducción dirigida, planificada y controlada. Este moderno manejo reproductivo constituye uno de los procesos fisiológicos más importantes dentro de la producción y economía pecuaria, los cuales están encaminados a solucionar las crecientes necesidades de proteína animal para nuestra población. Esta problemática es favorecida actualmente por los procesos biotecnológicos reproductivos aplicados al mejoramiento genético de la masa ganadera de amplio y rutinario uso en los países desarrollados, en que el Bebé Probeta en Ganadería (Fecundación *in vitro*) juega un papel relevante, gracias a las ventajas que ofrece esta biotecnología de punta en las especies de animales uníparas (una gestación por año) en cuanto a la rápida obtención de descendencia numerosa y de gran valor genético. Convirtiéndose de una reproducción lenta en mostrar sus resultados, en una reproducción muy rápida, como se está realizando actualmente en el ganado bovino y que pretendemos hacer en nuestros camélidos de los andes.^{1,2}

BIOTECNOLOGÍA DE PUNTA QUE NECESITA EL PAÍS

Los primeros estudios realizados para la reanudación de la meiosis y la conservación de los oocitos viables tiene ya muchos años. Después, siguieron trabajos para fecundar los oocitos con espermatozoides en forma *in vitro*. Sin embargo, se demostró que la mayor parte de esta técnica realizada hasta esos momentos, no alcanzaban el desarrollo embriológico adecuado, al parecer por la no capacitación de los espermatozoides.³

En condiciones naturales, la producción de células germinales de las hembras de los animales domésticos es muy limitada si lo comparamos con las del macho, y en el caso de las hembras uníparas se llega a un solo oocito por ciclo estrual (vacunos, camélidos, yegua, etc.) por lo tanto, sólo se aprovecha un mínimo de su población de gametos de las hembras, a pesar que su potencial ovárico es muy elevado. Recuperar gran parte de este excedente en la población de óvulos de animales con características hereditarias valiosas constituye un recurso de potencial reproductivo importantísimo que se debe aprovechar para lograr un mejoramiento genético mucho más rápido para nuestra ganadería.

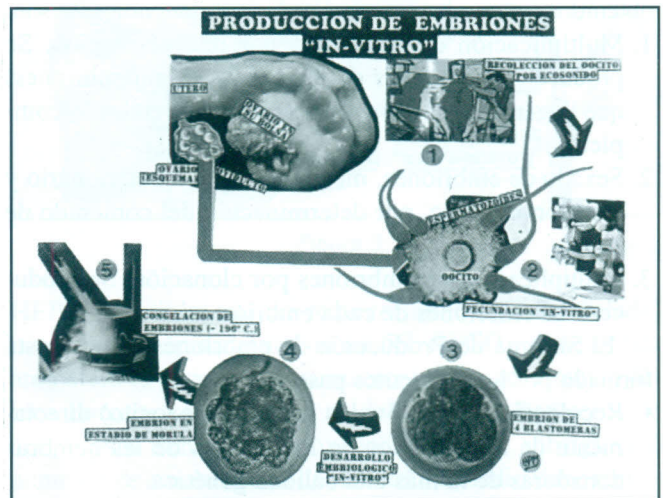


Figura 1

La producción de embriones en gran escala totalmente en el laboratorio o Fecundación *in vitro*, es uno de los procesos biotecnológicos con mayor trascendencia que se ha desarrollado en la producción animal aplicada para el mejoramiento genético de los rebaños para incrementar la producción, especialmente en países subdesarrollados como el nuestro, donde se ha realizado muy poca selección selectiva.

El sistema reside en que los óvulos u oocitos (ovocitos), como se suele llamar a los gametos de la hembra, son recolectados vía transvaginal guiados por ultrasonido, dos veces por semana y semana tras semana, directamente de los folículos de los ovarios de hembras de la más alta calidad genética que se obtuvo en la primera etapa. Estos óvulos luego de un periodo de maduración en el laboratorio son fecundados *in vitro* con espermatozoides capacitados de semen de machos genéticamente superiores. De forma que se crean embriones que se desarrollarán *in vitro* hasta el estadio transplantable de mórula (7 a 8 días post-fecundación). Luego, así formados son congelados y criopreservados por tiempo indefinido a temperatura de nitrógeno líquido (-196 °C) en pajillas de plástico de 0.25 ml de capacidad. Posteriormente, una vez descongelados, serán transplantados a hembras receptoras nativas sincronizadas de poca calidad genética para continuar su desarrollo normal de gestación hasta el parto (Fig 1).

Cuando este sistema está en operación comercial continua a través del año, en promedio –todo este proceso descrito, incluyendo el transplante y gestación hasta el parto de las hembras receptoras– se obtiene de 1 a 2 crías por

*Médico Veterinario, Presidente del Instituto de Reproducción y Biotecnología Pecuaria (I.R. Biotec-Pecuaria)

hembra donante al mes. Este promedio puede ser aumentado si se aplica un tratamiento hormonal para producir en los ovarios crecimiento y maduración folicular múltiple en las hembras donantes antes de la recolección de ovocitos.

En apoyo a este sistema de producción de embriones *in vitro* se desarrollará otras biotecnologías para incrementar la eficiencia en la producción a partir de los embriones obtenidos y antes de congelarlos. Estas biotecnologías son:

1. Multiplicación de embriones por microbisección. Se producen dos mitades de embriones (hemiembriones) que llegan a regenerarse hasta formar un embrión completo.
2. Sexado de embriones, mediante biopsia embrionario y elección del sexo, por determinación del contenido de ADN.
3. Multiplicación de embriones por clonación. Se produce 8-10 embriones de cada embrión original.

El Sistema de Producción de embriones *in vitro* está formado por los siguientes pasos:

- Recolección de los óvulos (oocitos u ovocito) directamente de los folículos de los ovarios de las hembras donadoras de la más alta calidad genética.
- Maduración de los ovocitos *in vitro* en el laboratorio.
- Capacitación de espermatozoides de semen genéticamente superiores.
- Fecundación *in vitro* de los óvulos madurados por los espermatozoides capacitados.
- Desarrollo *in vitro* de los oocitos recién fecundados hasta el estadio embriológico transplantable de mórula (7 a 8 días post fecundación).
- Congelación de los embriones de 7 - 8 días post fecundación para almacenarlos y formar el Banco de Embriones y después usarlos en forma masiva.

RECOLECCIÓN DE OVOCITOS

Laparoscopia

La endoscopia es la técnica que permite la percepción visual de cualquier cavidad corporal mediante un endoscopio. La laparoscopia es un ejemplo de procedimiento endoscópico no invasivo que requiere de un mínimo de cirugía que permite el examen visual y manipulación de órganos y estructuras internas de la cavidad peritoneal y pélvica y su contenido, después de establecer un neumoperitoneo.

Para la recolección de los oocitos de los ovarios con fines a la fecundación *in vitro*, la laparoscopia ha sido la técnica de preferencia, y se describieron con gran detalle los métodos laparoscópicos para la aspiración de los ovocitos.^{4,5} Por nuestra parte, hemos empleado este método para recolectar oocitos de las vicuñas. Para eso empleamos un juego de agujas como trocar-cánula, donde la aguja corta perfora la pared abdominal o vaginal, para después introducir la aguja larga dentro de ella, esta última aguja está conectada a una jeringa en su extremo y con

ayuda del laparoscopio y la pinza, esta aguja penetra al folículo e inmediatamente absorbe su contenido, es decir el cumulus ooforo con el óvulo⁶. Sin embargo, dicho procedimiento no está exento de problemas. En la actualidad la laparoscopia, para este fin, ha sido reemplazada por el ultrasonido por las ventajas que ofrece. Con el método de ultrasonido indudablemente se simplificará la recuperación de oocitos para la fecundación *in vitro*, toda vez que se trabaja bajo anestesia local, en menos tiempo quirúrgico, sin la creación de un neumoperitoneo, etc.

Ultrasonido

Los ultrasonidos son ondas sonoras con una frecuencia determinada que las hace no audibles por el oído humano. Su aplicación en el diagnóstico clínico se fundamenta en el principio del eco, debido a esto es que los exámenes se denominan Ecografías. En la progresión de los ecos en un medio, gran parte de ellos van a ser reflejados cuando chocan en su camino con otro medio diferente produciendo ecos que van a ser visualizados en la pantalla.

La técnica emplea un transductor sectorial vaginal con una guía que permite la recolección por aspiración de los compuestos cúmulos-ovocitos transvaginales directamente de los folículos de los ovarios guiado por ultrasonido. Con este procedimiento podemos acceder a los ovarios sin necesidad de cirugía y bajo anestésico local, en menos tiempo, sin necesidad de neuroperitoneo y causando menor incomodidad que una inseminación⁷.

Este sistema de ultrasonografía está formado por una unidad de ultrasonido con una pantalla de televisor con un teclado de mando. Esta unidad se conecta un transductor vaginal con una ranura o conducto en el dorso que permite alojar la aguja larga aspiradora que posee en su extremo un sonar, mediante el cual guía a la aguja para realizar la punción folicular con suma precisión. Esta aguja puede ser de luz simple o doble; esta última, permite realizar un minilavado folicular o "miniflushing".

Colocada la hembra donante de oocitos en un brete de sujeción en posición erguida, se procede a aplicar la anestesia epidural baja para luego lavar profusamente con agua y jabón la zona perineal. Al costado del brete se ha ubicado el aparato de ultrasonido de tal forma que se domine la visión en la pantalla. Se procede a introducir el transductor sectorial con la aguja aspiradora en la vagina de la hembra, de tal forma que su extremo llegue al fórnix vaginal posterior. El transductor está conectado al monitor y la aguja aspiradora se conecta, mediante una tubería de diámetro delgado, a un frasco recolector de 50 ml al vacío (Falcon 2070). El operador, mediante tacto rectal, sujeta el ovario y una vez que lo tiene puesto contra la extremidad terminal del transductor que está colocado en la cúpula vaginal. El transductor transmite la imagen en la pantalla y se puede apreciar allí el ovario y los folículos. A continuación, la extremidad aguda y puntiaguda de la aguja aspiradora penetra a través de la pared del fórnix vaginal

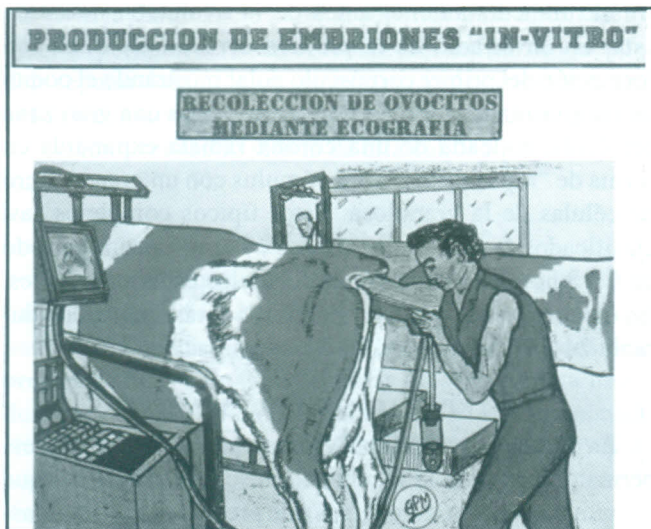


Figura 2

posterior, que, a la tracción ejercida sobre ella, presenta un menor grosor. Luego, pasa la aguja la pared del folículo y aspira los complejos cúmulos-ovocitos de cada folículo, visualizando y guiándose durante todo el proceso por las imágenes transmitidas por el transductor y el sonar de la aguja a la pantalla⁸. (Figs. 2 y 3).

MEDIO DE CULTIVO

Los óvulos sin fecundar y los embriones se deben guardar viables en soluciones de nutrientes que establezcan condiciones similares al del líquido tubárico. Los factores que pueden afectar la viabilidad durante el periodo de cultivo son la temperatura, pH, osmolaridad, esterilidad y toxicidad del medio.

Excepto durante la evaluación ovular o embrionario, se deben guardar en recipientes cubiertos y en un medio de cultivo a temperatura ambiente de laboratorio temperado o en un horno incubador. La temperatura en el incubador se debe mantener a 37 °C. Hay que considerar que cada vez que se abra la puerta del incubador, la temperatura cae 0.1 °C a 0.5 °C, que puede afectar al material incubado.

El medio de cultivo debe ser amortiguado (bufferado) para mantener un pH óptimo y estable (7.2 - 7.6) y una osmolaridad de 270 - 310 mOsm/kg. La mayoría de los medios de cultivo actualmente son bastante complejos en un esfuerzo por mejorar el crecimiento in vitro (TCM 199, HAM-F10, PBS, etc.) que incluyen, además de sales inorgánicas, varios aminoácidos, vitaminas, con un ion bicarbonato utilizado como sistema amortiguador (buffer) que depende del equilibrio con una atmósfera de 5% de CO₂. Si el volumen de gas en el recipiente es pequeño relativo al del medio de cultivo, la atmósfera y el pH serán adecuadamente mantenidos, simplemente guardando el medio en un recipiente al vacío. Si no se consigue, entonces el medio debe guardarse en una incubadora con una atmósfera de 5% o deberá ser inyectado con esta mezcla a intervalos regulares. El pH del medio amortiguado con

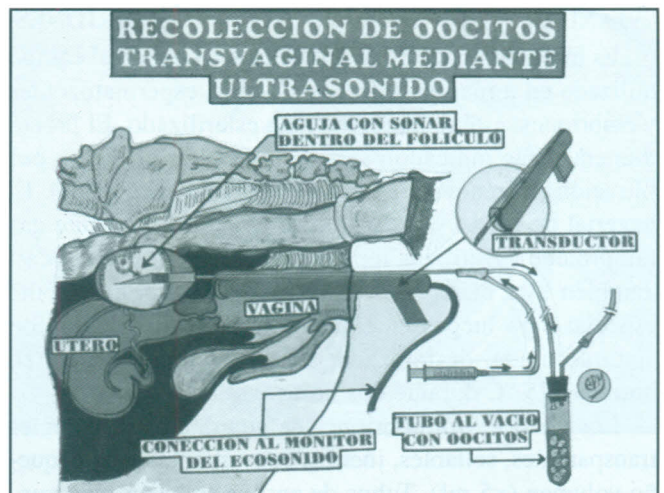


Figura 3

HEPES (tampón que no requiere atmósfera controlada) no aumenta rápidamente sin un 5% de CO₂, aunque esta atmósfera es necesaria para mantener la concentración del bicarbonato. La humedad se deberá mantener cerca de 100% para minimizar la evaporación y el subsiguiente aumento de osmolaridad del medio. El medio debe contener antibióticos para contrarrestar el crecimiento de microorganismos, por ejemplo, 100 U.I. de penicilina G y 50 µg de sulfato de estreptomicina por ml (Fig. 4).

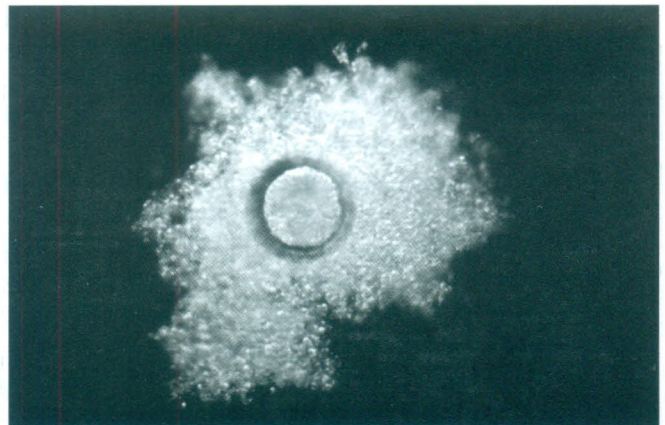


Figura 4

Existe una gran variedad de medios de cultivo que pueden utilizarse para los oocitos, espermatozoides, fecundación y embriones, el más usado es el fosfato salino tamponado de Dulbecco (PBS de Gibco). Este medio tiene la particularidad que su buffer es fosfato lo que lo hace más estable a los cambios de pH; además, es un medio de fácil preparación, sus componentes son encontrados sin mayores problemas en el comercio y son de relativo bajo costo. A todos estos medios complejos, son enriquecidos con distintas concentraciones (10-20%) de proteínas como suero fetal, albúmina bovina, suero de vaca en la etapa de estro (tratados por calor a 56 °C, por 30 minutos), glucosa (1 mg/ml) y piruvato de sodio (0.33mM).^{9,10}

MANIPULACIÓN DE OVOCITOS Y EMBRIONES

Es importante que el medio de cultivo y todo el equipo utilizado en la manipulación de oocitos, espermatozoides y embriones, esté deliberadamente esterilizado. El procedimiento más indicado es el de esterilizar el medio por filtración (filtros de 0.45 μm o poros más pequeños). El material de vidrio y/o plástico se esteriliza mediante gas (amprolene) y utilizar técnicas estrictamente asépticas. También este material puede ser lavado con detergente especial para luego ser enjuagado cuidadosamente con agua destilada, desionizada, secados y esterilizados en horno a 175 °C durante dos horas.

Los oocitos y/o embriones se guardan en recipientes transparentes, sellables, inertes, convenientes y de pequeño volumen (<5 ml). Tubos de ensayo trabajan bien aunque deben ser vaciados a otros recipientes para localizar el ovocito o embrión bajo el microscopio. Placas pequeñas de Petri también pueden ser utilizadas. El medio con la muestra puede ser cubierto por una fina capa de aceite mineral para prevenir la evaporación, reducir la contaminación y regular el cambio de gas en el medio y la atmósfera.¹¹

Desde el momento que ellos son recolectados, los ovocitos deben ser manipulados con procedimientos estériles. Para esto los oocitos y embriones deben ser aspirados en la minipipeta con un pequeño volumen de medio (<de 0.2 ml) para prevenir contaminaciones del medio fresco. Ellos se deben manejar con mucho cuidado para evitar causarles el mínimo daño. La localización, manipulación y evaluación deberá hacerse lo más rápido posible con el fin de regresarlos a un medio más propicio. Las micropipetas para manipular están hechas de material pirex de 4 mm de diámetro, el largo es aproximado de 15 cm, éstas son calentadas en el centro y estiradas hasta que su diámetro llegue a 0.5-1 mm. El extremo es pulido con fuego, decreciendo su diámetro a 250 - 500 μm . El otro extremo es también pulido y conectado a una jeringa de 0.5 o 1 ml a través de un tubo de goma.

MADURACIÓN DE LOS OOCITOS

Para una mayor provisión de oocitos para la fecundación *in vitro*, las donantes son tratadas previamente con hormonas para inducirle el crecimiento y maduración folicular múltiple de un número de oocitos superior a lo normal. Esta inducción múltiple de folículos determina que se aspiren folículos preovulatorio del mismo tamaño y recolección del complejo cúmulos-ovocitos en condiciones óptimas. Por lo tanto el periodo de maduración *in vitro* de este gameto será de igual tiempo a fin de lograr porcentajes de fecundación y segmentación mayores. Sin embargo, la importancia práctica de determinar el grado de madurez del ovocito sigue siendo un problema que solamente con la experiencia se puede solucionar.

Los complejos cúmulos ovocitos preovulatorios de mamíferos recogidos por aspiración y guiados por ultra-

sonido inmediatamente antes de la ovulación muestran estar en un estadio de la primera división meiótica con formación del primer corpúsculo polar mostrando el oocito un citoplasma uniforme y homogéneo, con una gran zona prelúcida, rodeada de una corona radiata expandida en forma de "rayos de sol" y un cúmulus con un gran número de células de la granulosa. Estos típicos complejos así clasificados fueron preincubados *in vitro* por un periodo de 6 a 8 horas antes de la unión con los espermatozoides. En cambio en los oocitos inmaduros serán incubados durante 24 a 36 horas antes de la inseminación.^{12,13}

PREPARACIÓN DEL SEMEN

En la maduración final y preparación natural del espermatozoide para la fecundación, se ha descubierto que el oviducto tiene componentes que prepara al gameto masculino para fecundar el óvulo, llamado este proceso de Capacitación Espermática. Se trata de la reacción acrosoma que sufre el espermatozoide para que libere importantes enzimas para penetrar al ovocito satisfactoriamente. Este proceso acrosómico de la cabeza del espermatozoide implica fusión entre la membrana acrosoma externa y la membrana plasmática de la célula, previa fase de hinchamiento, formándose en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide una serie de vesículas que al abrirse permite el escape de enzimas líticas que actúan en las células de la granulosa y zona pelúcida.¹⁴

Los planteamientos experimentales para efectuar la capacitación artificial de los espermatozoides y/o la reacción acrosómica han incluido varias sustancias biológicas. Como resultado de estas observaciones se desarrolló la capacitación de semen de alta frecuencia al suministrar heparina cuando se está en cultivo con el óvulo, durante un periodo de 4 a 6 horas.¹⁵⁻¹⁷

Para la inseminación se pueden usar las pajuelas de plástico de 0.50 ml o dos de 0.25 ml de semen congelado provenientes de toros de fertilidad probada *in vivo*, los que son descongelados en baño térmico de agua a 37 °C por 20 segundos. La fracción móvil del semen es recuperada por la técnica de "natación ascendente" (swim up), en la que se pone el semen en una columna en la cual las célu-

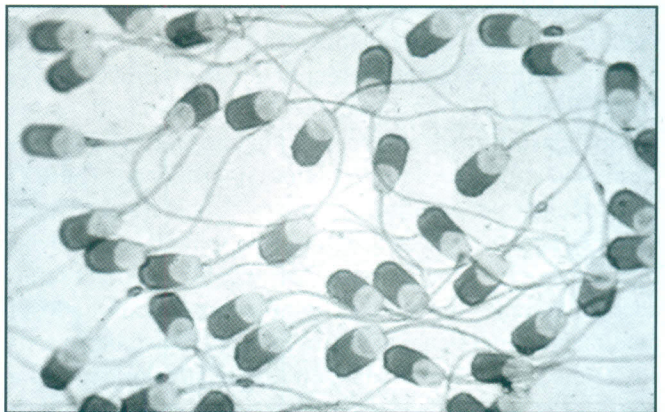


Figura 5

las vivas nadarán hacia la parte superior y las anormales o muertas permanecerán en el fondo. Del mismo modo, pueden separar los mejores espermatozoides mediante un gradiente discontinua de Percoll.¹⁸ Con estos procedimientos estamos retirando semen de alta calidad para fecundar los óvulos. (Fig 5).

FECONDACIÓN *IN VITRO*

Esbozamos aquí brevemente el protocolo que se usa para la fecundación *in vitro* del bovino. Los ovocitos que han sido incubados durante 6 a 8 horas (si se les considera preovulatorios) o de 24 a 36 horas (si se considera inmaduros) en medio de cultivo celular TCN-199 tamponado en bicarbonato 26 mM a pH 7.2 a 38.5°C con un 99% de humedad relativa y 5% de CO₂. Esta maduración puede ser realizada en pocillos con 0.75 ml de medio/embrión cubierto con aceite mineral estéril.¹⁹

Por otro lado, con una parte de la fracción móvil del semen de la mejor calidad es lavado por centrifugación dos veces en el medio de inseminación.²⁰

Los oocitos incubados fueron retirados de las gotas de maduración y llevadas a las gotas de inseminación (20 a 25 ovocitos/gota) con una mínima cantidad de medio e incubados en las mismas condiciones iguales de cultivo a las de la maduración. Después de la fecundación *in vitro* el medio de las gotas fue removido parcialmente (50%) cada 48 horas. Las observaciones fueron realizadas a las 48 horas para evaluar la tasa de segmentación y cada 24 horas hasta el día 7 para el estudio de desarrollo a mórula y/o blastocisto.²¹

El sistema de cultivo *in vitro* se mantiene en la oscuridad, excepto cuando se examina al microscopio como es natural. Los oocitos fecundados presentan los pronúcleos de la misma células y la del espermatozoide a las 14 o 18 horas después de la fecundación. Luego de las 24 horas en adelante de cultivo, los embriones serán evaluados mucho mejor si se cuenta con un microscopio invertido y el sistema de contraste de fases, se registran estadios de segmentación. A los 6 a 8 días se visualizan mórulas o blastocistos precoces que están preparados para el trasplante definitivo a las hembras receptoras o para la ultracongelación para formar los Bancos de Embriones y posterior uso en forma masiva. Mediante este procedimiento de fecundación *in vitro*, se produce un número considerable de embriones viables, por lo que sería más aconsejable que se implante los embriones bajo un sistema de sincronización masiva y empleando las técnicas de trasplante por laparoscopia o ultrasonido que eleva considerablemente los porcentajes de preñez.^{22,23} (Fig. 6).

Literatura citada

1. Gordón, and Lu, KH. Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology* 33: 77-87, 1990.
2. Palomino, H. Biotecnología del Trasplante y Micronaipulación de Embriones Bovinos y de Camélidos de los Andes. A.F.A. Ed. Importadores S.A. 446 pp, Lima-Perú, 2000.
3. Louis, MM. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology* 43: 51-60, 1995.



Figura 6

4. Bracket, BG; Bousquet, D; Boice, ML; Donswick, WW; Evans, JF and Dressel, MA. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod* 27:147-158, 1982.
5. Lambert, RD; Sirard, MA; Bernard, C; Beland, R; Rioux, JE; Leclec, P; Monard, DP and Bedoya, M. *In vitro* fertilization of bovine oocytes natedured *in vivo* and collected at laparoscopy. *Theriogenology* 25:117-134, 1986.
6. Pieterse, MC; Vos, PL; Kruip, Amwurth, YA; Von Beneden, H; Willemsse, AH and Taverne, MAM. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in egg-treated cows. *Theriogenology* 35:401-413, 1991.
7. Wikland, M; Enk, L and Hamberger, L. Transvesical and transvaginal approaches for the aspiration of follicles by use of ultrasound. *Ann NY Acad Sci*, 442:182, 1985.
8. Nagao, Y, Saeki, K; Hoshi, M; Takahashi, Y and Kanagawa, H. Effects of water quality on *in vitro* fertilization and development of bovine oocytes in proteinfree medium. *Theriogenology* 44:433-444, 1995.
9. Vanlangendonck, A; Vansteenbrugge, A; Donnay, I; Vansoom, A; Berg, U; Semple, E; Grisart, B; Mermillod, P; Brem, G; Massip, A and Dessy, F. Three year results on *in vitro* production of bovine embryo in serum-poor bovine oviduct conditioned medium.an over-view. *Reprod Fertil Dev*, 36:493-502, 1996.
10. Pascal, ML; Díaz, E.; Gutierrez, G; Sánchez, F. Y de Arguello, S. El aceite mineral en la fertilización *in vitro* como factor de riesgo para el desarrollo embrionario. *Archivos de Reproducción Animal*. Madrid- España 6:20-25, 1998.
11. Veeck, LL. Extracorporal maturation. Norfolk. *Ann NY Acad Sci*, 442:357, 1985.
12. Stubbings, RB; Liptrap, RM, Batteridge, K.J., Walton, TS, Armstrong, DT and Basur, PK. Requirements for bovine oocyte maturation *in vitro*. *Reprod Dom Anim*, 25:158-166, 1990.
13. Bedford, JM and Cooper, GW. Membrane fusion events is the fertilization of vertebrate eggs. In "Membrane Fusion" (G. Poste and GL Nicolson, ed.) pp 65-125. Elsevier. North Holland Biochemical Press, Amsterdam, 1978.
14. Parrish, JJ; Susko-Perrish, JL; Leibfried, Rutledge, ML; Critser, ES; Eyestone, WH and First, NL. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25: 591-600, 1996.
15. Blottner, S; Nehring, H and Toner, H. Individual differences in capacitating of bull spermatozoa by heparin *in vitro*; relationship to fertility. *Theriogenology* 43: 619-628, 1990.
16. Rosenkrans, CF; Glied, DW and Pierson, JN. Cleavage of bovine zygote following heparin during maturation and centrifugation prior to *in vitro* fertilization. *Theriogenology* 43: 289 (Abs) 1990.
17. Parrish, JJ; Krongenaes, A and Susko-Parrish, JL. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 44:859-869, 1995.
18. Carolan, C; Lonergan, P; Van Langendonck, A and Mermillod, P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Theriogenology* 43: 1115-1128, 1995.
19. Larocca, C; Romano, JE; Calvo, J; Lago, I; Fila, D; Roses, G; Viqueira, M; Kmaid, S and Imai, K.. Relation between bulls and semen preparation on *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology* 45: 267, 1996.
20. Xu, KP; Pollard, W; Rorie, RW; Plante, L; King, WA and Betteridge, KJ. Pregnancy rates following transfer of bovine embryos produced by *in vitro* maturation, fertilization and co-culture. *Theriogenology* 33: 351, 1990.
21. Pinyopummintr, T and Bavister, BD. Development of bovine embryos derived from *in vitro* matured/fertilized oocytes into morulae/blastocysts in a chemically-defined, protein free culture medium. *Biol Reprod*, 45:736-742, 1991.
22. Boone, WR and Shapiro, SS. Quality control in the *in vitro* fertilization laboratory. *Theriogenology* 33: 23-50, 1990.
23. Gorill, MJ; Einehart, JS *et al.* Comparison of the hamster sperm motility assay to the mouse one-cell and two-cell embryo bioassays as quality control tests for *in vitro* fertilization. *Fert Steril*, 55:345-354, 1991. (MV)