

**REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
COMISIÓN DE ESTUDIOS PARA GRADUADOS
DOCTORADO EN CIENCIAS VETERINARIAS**



**EVALUACIÓN DE DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO SOBRE LA
PRODUCCIÓN, VITRIFICACIÓN Y ULTRAESTRUCTURA DE BLASTOCISTOS
BOVINOS MESTIZOS PRODUCIDOS *IN VITRO***

TESIS DOCTORAL

MSc. Francisco José Báez Contreras
Estudiante graduado

Dra. Patricia C. Villamediana Monreal
Tutora

Maracay, marzo de 2015.



**EVALUACIÓN DE DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO SOBRE LA
PRODUCCIÓN, VITRIFICACIÓN Y ULTRAESTRUCTURA DE BLASTOCISTOS
BOVINOS MESTIZOS PRODUCIDOS *IN VITRO***

TESIS DOCTORAL

MSc. Francisco Báez Contreras
Estudiante graduado

Dra. Patricia Villamediana
Tutor (FEC-LUZ)

Dr. Hugo Hernández Fonseca
Comité Asesor (FCV-LUZ)

Dra. Irene Zabala
Comité Asesor (FEC-LUZ)

Dr. Armando Quintero
Comité Asesor (FCV-LUZ)

MSc. Adriana Fernández
Comité Asesor (FCV-UCV)

Maracay, marzo de 2015.



VEREDICTO

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Ciencias Veterinarias y el Consejo de Estudios de Postgrado de la Universidad Central de Venezuela, para examinar la **Tesis Doctoral** presentada por: **FRANCISCO JOSÉ BAEZ CONTRERAS**, Cédula de identidad N° 14.356.421, bajo el título "EVALUACIÓN DE DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCIÓN, VITRIFICACIÓN Y ULTRAESTRUCTURA DE BLASTOCISTOS BOVINOS PRODUCIDOS *IN VITRO*", a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día 18 de marzo de 2015 a las 10:30 a.m., para que el autor lo defendiera en forma pública, lo que éste hizo en el Salón de Usos Múltiples del Postgrado, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **APROBARLO**, por considerar, sin hacerse solidario con la ideas expuestas por el autor, que se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

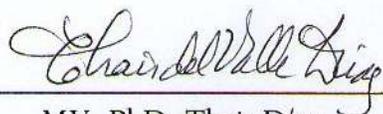
Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado constituye un aporte original al estudio de la biología del blastocisto bovino mestizo y a la estandarización de un sistema de cultivo y criopreservación de embriones bovinos en Venezuela. Con base en la discusión sostenida, luego de la presentación del trabajo, el jurado sugiere el cambio de título a: "EVALUACIÓN DE DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCIÓN, VITRIFICACIÓN Y ULTRAESTRUCTURA DE BLASTOCISTOS BOVINOS MESTIZOS PRODUCIDOS *IN VITRO*".

.../...

[Handwritten signatures and initials on the left margin]

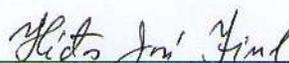
3.-El jurado por unanimidad decidió otorgar la calificación de EXCELENTE al presente trabajo por considerarlo de excepcional calidad ya que representa un avance al conocimiento del área.

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los 18 días del mes de marzo del año 2015, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Coordinadora del jurado la Dra. Patricia Villamediana.



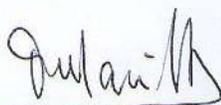
MV. PhD. Thais Díaz
C.I.No. V- 4.550.709
FCV-UCV

Jurado designado por el Consejo
de la Facultad



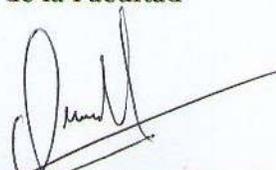
Lic. PhD. Héctor Finol
C.I.No. V- 1.731.960
FC-UCV

Jurado designado por el Consejo
de la Facultad



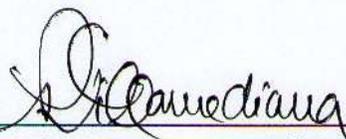
Lic. PhD. Reinaldo Marín
C.I.No.V- 4.245.480
IVIC

Jurado designado por el Consejo
de Estudios de Postgrado



Lic. Dr. Oscar Vera
C.I.No.V- 18.780.334
FCV-UCV

Jurado designado por el Consejo
de Estudios de Postgrado



MV, Dra. Patricia Villamediana
C.I.No.V- 10.446.255

LUZ
Tutora

PV/RM/OV/TD/HF
18/03/15

ÍNDICE DE CONTENIDO

Índice de tablas	vii
Índice de figuras	viii
Abreviaturas	xi
Resumen	xv
Abstract	xvi

	Página
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
1. Producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos	8
1.1. Maduración <i>in vitro</i>	8
1.2. Fecundación <i>in vitro</i>	14
1.2.1. Valoración de la fecundación	17
1.2.2. Anomalías de la fecundación	17
1.3. Cultivo <i>in vitro</i> de embriones	19
2. Características de los embriones PIV	23
2.1. Morfología	24
2.1.1. Gotas lipídicas	25
2.2. Metabolismo de los embriones preimplantacionales	29
2.3. Expresión del genoma embrionario	30
3. Criopreservación	34
3.1. Principios básicos de criobiología	34
3.2. Crioprotectores	37
3.2.1. Penetrantes	37
3.2.2. No penetrantes	37
3.2.3. Mezcla de crioprotectores	38
3.3. Técnicas	39
3.3.1. Congelación	39
3.3.2. Vitricación	40
3.3.3. Vitricación ultrarrápida	41

3.4. Alteraciones causadas por la criopreservación	43
3.5. Estrategias para la criopreservación de embriones bovinos PIV.	45
3.6. Valoración del desarrollo y cambios ultraestructurales de los embriones PIV frescos y vitrificados	48
MATERIALES Y MÉTODOS	54
1. Obtención y maduración <i>in vitro</i> de ovocitos bovinos	55
2. Fecundación <i>in vitro</i>	56
3. Cultivo <i>in vitro</i> de embriones	57
4. Vitrificación de blastocistos en <i>fibreplug</i>	58
5. Valoración de los Resultados	59
5.1. Progresión meiótica de los ovocitos	59
5.2. Evaluación de la fecundación <i>in vitro</i>	59
5.3. Evaluación de la división y desarrollo embrionario	60
5.4. Supervivencia embrionaria post-calentamiento	60
5.5. Contenido lipídico	60
5.6. Tinción de apoptosis	62
5.7. Microscopía electrónica de transmisión (MET)	63
6. Diseño Experimental	64
Experimento 1:	64
<i>PIV de embriones bovinos en diferentes sistemas de cultivo.</i>	
Experimento 2:	64
<i>Tasa de supervivencia y calidad embrionaria de blastocistos bovinos vitrificados en fibreplug.</i>	
Experimento 3:	65
<i>Efecto del EGF sobre la supervivencia y calidad post-calentamiento de blastocistos bovinos PIV.</i>	
7. Análisis Estadístico	65
RESULTADOS	66
<i>PIV de embriones bovinos en diferentes sistemas de cultivo.</i>	67
<i>Supervivencia y calidad embrionaria de blastocistos bovinos vitrificados en fibreplug.</i>	77
<i>Efecto del EGF sobre la supervivencia y calidad post-vitrificación de blastocistos bovinos PIV.</i>	85
	87
DISCUSIÓN	137
CONCLUSIONES	137
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139

Tabla		Página
1	Índices de gestación y nacimientos, tras la transferencia de embriones bovinos producidos <i>in vitro</i> y criopreservados.	45
2	Composición del medio de capacitación espermática.	56
3	Composición del medio TL-Semen.	57
4	Composición del medio TL-FIV.	57
5	Composición del medio mSOFaaci.	58
6	Progresión meiótica de ovocitos bovinos madurados <i>in vitro</i> .	67
7	Tasa de fecundación <i>in vitro</i> de ovocitos bovinos.	68
8	Efecto del suplemento en el medio de cultivo mSOFaaci sobre la tasa de división embrionaria.	69
9	Efecto del suplemento en el medio de cultivo mSOFaaci sobre el desarrollo de embriones bovinos PIV.	70
10	Detección de apoptosis mediante TUNEL en blastocistos bovinos producidos <i>in vitro</i> en diferentes sistemas de cultivo.	73
11	Tasa de re-expansión de blastocistos bovinos vitrificados en <i>fibreplug</i> .	77
12	Efecto del proceso de vitrificación sobre la calidad de blastocistos bovinos producidos <i>in vitro</i> .	79
13	Efecto de la incorporación del EGF sobre la re-expansión y calidad de blastocistos bovinos producidos <i>in vitro</i> y vitrificados en <i>fibreplug</i> .	86

Figura		Página
1	Modelo de la producción de gotas lipídicas en una blastómera de embrión bovino.	28
2	Representación esquemática de la cantidad de RNAm correspondiente a ovocitos de baja y moderada calidad, mostrando el decaimiento de la cantidad de RNAm a medida que el embrión avanza hasta el estadio de blastocisto.	32
3	Rejilla para la cuantificación de gotas lipídicas en embriones teñidos con Sudan Black B.	61
4	Conversión semicuantitativa del contenido de lípidos bajo el software Adobe Photo Shop Actendex (400X).	62
5	Progresión meiótica de ovocitos bovinos madurados <i>in vitro</i> (400X): (a) TeloI, (b) MII+CP. Ovocitos bovinos degenerados: (c) MI, d) Material nuclear degenerado.	67
6	Valoración de la fecundación <i>in vitro</i> (400X): ovocitos penetrados: (a) 2PN (flechas blancas), (b) 3PN, (c) 1 PN.	68
7	División y desarrollo embrionario: (a) Embriones bovinos de varios estadios de > 4 células (D3) (20X), (b) Blastocistos bovinos expandidos (D8) 50X.	70
8	Blastocistos de D8 de cultivo teñidos con Sudan Black B (600X): (a) Tratamiento con medio mSOFaaci: PVA, (b) BSA y (c) BSA+5%FCS y (d) BSA+1%FCS.	71
9	Efecto de diferentes sistemas de cultivo sobre el número de gotas lipídicas pequeñas (<2µm), medianas (2-6µm) y grandes (>6µm) en blastocistos bovinos PIV.	71
10	Análisis de imagen (medida semicuantitativa) de gotas lipídicas de blastocistos bovinos producidos <i>in vitro</i> cultivados en diferentes sistemas de cultivo.	72
11	Blastocistos bovinos teñidos con TUNEL (400X): (a) blastocisto del control negativo, (b) blastocisto con células apoptóticas en rojo (flechas blancas, 520 nm), (c) blastocisto con células normales azules y células apoptóticas en verde	73

- (flechas blancas, 460 nm), (d) blastocisto del control positivo.
- 12 Micrografías de secciones semifinas (700 nm) de blastocistos bovinos frescos de día 8 de cultivo en medio mSOFaaci (1000X): A) PVA, B) BSA, C) BSA+ 5%FCS y D) BSA + 1% FCS. Se muestra la zona pelúcida (ZP), blastocele (BC), trofoectodermo (TE), masa celular interna (MCI), gotas lipídicas (flecha blanca), espacio perivitelino (cabeza de flecha blanca) y espacios intercelulares (*). Barra=10µm. 74
 - 13 Micrografías de secciones ultrafinas (80 nm) de blastocistos bovinos frescos. Blastocistos producidos *in vitro* de D8 en medio mSOFaaci: A) PVA (X2.000), A´) células de la masa celular interna (MCI) (X5.000), B) BSA (X10.000) y B´) retículo endoplasmático liso (REL) y lisosomas (Ls). Zona pelúcida (ZP), células del trofoectodermo (TE), células de la masa celular interna (MCI), espacio perivitelino (EP), mitocondria (M), núcleo (N), gotas lipídicas (L), vacuolas (V), aparato de Golgi (AG), red de retículo endoplasmático liso rugoso (RER), blastocele (BC). 75
 - 14 Micrografías de secciones ultrafinas (80 nm) de blastocistos bovinos frescos. Blastocistos producidos *in vitro* de D8 en medio mSOFaaci: C) BSA + 5% FCS (X3.000) y D) BSA + 1% FCS (X8000). Zona pelúcida (ZP), células del trofoectodermo (TE), microvellosidades (cabeza de flecha blanca), mitocondria (M), núcleo (N), gotas lipídicas (L), vacuolas (V), espacio perivitelino (EP), uniones estrechas (flechas blancas), aparato de Golgi (AG), red de retículo endoplasmático liso (REL) (cabeza de flecha negra). 76
 - 15 Blastocistos re-expandidos (flechas blancas) y no re-expandidos (flechas negras) (50X). Barra=2mm. 78
 - 16 Micrografías de secciones semifinas (700 nm) de blastocistos bovinos re-expandidos y fijados dos h después de la vitrificación (1.000X). Blastocistos producidos *in vitro* en medio mSOFaaci + PVA: A) Expandido de 8 d de cultivo, B) BSA, C) BSA+ 5%FCS y D) BSA + 1% FCS. Se muestra la ZP (zona pelúcida), BC (blastocele), TE (trofoectodermo), MCI (masa celular interna), gotas lipídicas (flecha blanca), células degeneradas (D) y restos celulares (*). Barra=10µm. 80
 - 17 Micrografías de secciones semifinas (700 nm) de blastocistos bovinos no re-expandidos, fijados dos h después del calentamiento y clasificados como degenerados (1.000X). A y B) Blastocistos producidos *in vitro* en medio mSOFaaci + PVA; C y D) Blastocistos producidos *in vitro* en medio mSOFaaci + BSA. Zona pelúcida (ZP). Se muestra desorganización celular, blastómeras degeneradas (DG) y colapso del blastocele. Barra= 20µm. 81
 - 18 Micrografías de secciones ultrafinas (80 nm) de blastocistos bovinos re- 82

- expandidos y fijados dos h después del calentamiento. Blastocistos producidos *in vitro* en medio mSOFaaci + PVA: A) Blastocisto 7 d de cultivo (X6.000), B) Blastocistos de 8 d de cultivo (X5.000) y C) Blastocisto expandido de 8 d de cultivo (X4.000). Abundantes restos celulares (RC), Mitocondria (M), mitocondria degenerada (d), mitocondria con matriz dilatada (**) y pocas crestas (flechas pequeñas), gotas lipídicas (L), vacuolas (V), zona pelúcida (ZP), pérdida de microvellosidades (cabeza de flecha blanca).
- 19 Micrografías de secciones ultrafinas (80 nm) de blastocistos bovinos re-expandidos y fijados dos h después del calentamiento. Blastocistos producidos *in vitro* en medio mSOFaaci + BSA: A) Blastocisto expandido de 8 d de cultivo (X2.500), B) Blastocisto expandido de 7 d de cultivo (X8.000) y C) Blastocistos de 7 d de cultivo (X8.000). Zona pelúcida (ZP), mitocondria (M), mitocondria degenerada (d), gotas lipídicas (L), gotas lipídicas (L), vacuolas (V), microfilamentos (flechas negras), abundantes restos celulares (RC), pérdida de unión entre blastómeras (cuadrado blanco). 83
- 20 Micrografías de secciones ultrafinas (80 nm) de blastocistos bovinos no re-expandidos y fijados dos h después del calentamiento: Blastocistos del cultivo de PVA: A y B (X3.000 y X6.000, respectivamente). Blastocistos del cultivo en BSA: C y D (X10.000 y X3.000, respectivamente). Zona pelúcida (ZP), mitocondria (M), mitocondria degenerada (d), gotas lipídicas (L), vacuolas (V), abundantes restos celulares (RC), pérdida de microvellosidades y espacio perivitelino (cabeza de flecha blanca), blastómera degenerada (DG) y aumento de espacio entre blastómeras (flecha blanca). 84

A-B

aa: aminoácidos
ACACA: Acetil CoA carboxilasa
AMPc: Adenosín monofosfato cíclico
AG: aparato de Golgi
AS: asincrónico
ATP: adenosina trifosfato
BC: blastocele
BME: medio basal eagle (Basal Medium Eagle)
BMP15: proteína morfogenética del hueso 15
BO: medio Brackett y Oliphant
BSA: albúmina sérica bovina (Bovine Serum Albumin)
BSA-FAF: albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (fatty acid-free BSA)

C-D-E

Ca⁺²: ión calcio
CAT: catalasa
CB: citocalasina B
CCII: condensación cromosómica II
CIV: cultivo *in vitro*
CLA: ácido linoléico conjugado
CO₂: dióxido de carbono
COC's: complejos cúmulo-ovocito (Cumulus- Oocyte Complex)
CP: corpúsculo polar
CPA: crioprotector
CPA's: crioprotectores
D0: día cero
D1: día uno
D3: día tres
DD6: día seis
D7: día siete
D8: día ocho
D9: día 9
D-Asp: D-aspartato
DE: desviación estandar
DG: diacolglicerol
DGT2: Acil Coa diacilglicerol aciltransferasa2
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucleico
EAA: aminoácidos esenciales (Essential Amino Acids)
EDTA: ácido etilen diamino tetracético (ethylenediaminetetracetic)
EGF: factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor)

EGFR: receptor de EGF (EGF Receptor)
EP: espacio perivitelino
EPIV: embriones producidos *in vitro*

F-G-H

FCS: suero fetal bovino (Fetal Calf Serum)
FGF: factor de crecimiento fibroblástico (Fibroblast Growth Factor)
FIV: fecundación *in vitro*
FSH: hormona estimulante del folículo (Follicle-Stimulating Hormone)
FSHr: receptor FSH (FSH Receptor)
G6FD. Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
GDF9: factor de crecimiento-transformación 9
GH: hormona de crecimiento
GPX: glutatión peroxidasa
GSH: glutatión reducido
GVBD: ruptura de la vesícula germinativa (Germinal Vesicle Breakdown)
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
hCG: gonadotropina coriónica humana (Human Chorionic Gonadotrophin)
HEPES: hidroxietilpiperazine ácido N-2-etaesúlfico
HHP: presión hidrastática subletal
hpi: h postinseminación
HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia
HPRT: enzima hipoxantina-fosforribosiltransferasa
Hsp70: proteína de estrés calórico 70

I-K-L

ICSI: inyección espermática intracitoplasmática (Intracytoplasmic Sperm Injection)
IFN-t: interferon tau
IGF: factor de crecimiento asociado a la insulina (Insulin-like growth factor)
IGF-I: factor de crecimiento asociado a la insulina-1
IGF-2: factor de crecimiento asociado a la insulina-2
ITS: insulina-transferrina-selenito
KDa: kilodalton
KSOM: medio optimizado simple de potasio (Potassium Simplex Optimized Medium)
LAH: eclosión asistida por laser
LC: L-carnitina
LH: hormona luteinizante (Luteinizing Hormone)
LOS: síndrome de exceso de volume fetal (Large Offspring Syndrom)
Ls: lisosoma

M-N

M: mitocondria
MAS: esterol activador de la meiosis
MCI: masa celular interna
mDM: medio definido modificado
MEB: micrscopía electrónica de barrido
MEM NEAA: medio mínimo esencial con aminoácidos no esenciales

MET: microscopía electrónica de transmisión
MFMV: método de vitrificación por microfiltración de membrana
MI: metafase I
MII: metafase II
MIV: maduración *in vitro*
MM: madio de mantenimiento
MPa: megapascal
MPF: factor promotor de la fase M (M-phase Promoting Factor)
MPGF: factor de crecimiento del pronúcleo masculino (Male Pronucleus Growth Factor)
mSOF: SOF modificado
mSOFaaci: SOF modificado suplementado con aminoácidos esenciales, no esenciales, myo-
inositol y citrato.
MV: microvellosidades
N: núcleo
N₂L: nitrógeno líquido
Na⁺: ión sodio
NaCl: cloruro sódico
NAD: nicotinamida adenina dinucleótido
NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida

O -P

O₂: oxígeno
OMI: factor inhibidor de la meiosis
OPS: open pulled straws
OPU: *Ovum Pick-Up*
OSFc: factores secretado por el ovocito
PAT: proteínas perilipin amino-terminal
PBS: solución salina fosfatada (Phosphate Buffered Saline)
PDE: fosfodiesterasa
PES: etiosulfato de fenazina
PF: vía de las pentosas fosfato (Pentoses Phosphate pathway)
pFSH: FSH de origen porcino (porcine FSH)
PGE2: prostaglandina E2
PHE: penicilamina, hipotaurina y epinefrina
pi: post-inseminación
PI3k: fosfatidilinositol 3 cinasa
PIV: producción *in vitro*
PKA: proteínkinasa A
PKB: proteínkinasa B
PKC: proteínkinasa C
PLIN2, 3, 4: proteína perilipin cola terminal alipofílica 2, 3 y 4
PLL-COOH: ε-poli-L-lisina carboxilada
PN: pronúcleo
PVA: alcohol-polivinílico (Polyvinyl Alcohol)
PVP: polivinil pirrolidona (Polyvinyl-pyrrolidone)

R-S-T

REL: retículo endoplasmático liso

r-hFSH: FSH recombinante humana

r-hLH: LH recombinante humana

RNA: ácido ribonucleico

RNA_m: RNA mensajero

RNA_r: RNA ribosomal

ROCK: proteincinasa en espiral asociada a Rho

ROS: especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species)

SOD2: superóxido dismutasa

SOF: fluido oviductal sintético (Synthetic Oviductal Fluid)

SOF_{aa}: SOF suplementado con amino ácidos

SPDF: factor estimulador del pronúcleo espermático (sperm pronucleus development factor)

spz: espermatozoides

TAG: triacilglicerido

TALP: medio Tyroides modificado (Tyroide Albumin Lactate Piruvate medium)

TAO: Transiluminación-aspiración ovárica

TCM-199: medio de cultivo 199 (Tissue Culture Medium 199)

TdT: enzima transferasa deoxynucleotidil terminal

TE: trofoectodermo

TGF- α : factor de crecimiento transformante α (Transforming Growth Factor α)

TGF- β : factor de crecimiento transformante β (Transforming Growth Factor β)

TUNEL: *terminal deoxynucleotidil transferase dUTP Nick end labeling*

U-X-Z

UI: unidades internacionales

VG: vesícula germinal

Xu-5P: xilulosa 5-fosfato

ZP: zona pelucida

RESUMEN

La producción de embriones bovinos se practica en todo el mundo para fines comerciales y de investigación. Una de las principales preocupaciones es el impacto de los sistemas de producción *in vitro* (PIV) sobre la calidad del embrión y su criotolerancia. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes sistemas de cultivo sobre la producción y calidad antes y después de la vitrificación de blastocistos bovinos PIV, utilizando el medio de fluido oviductal sintético modificado (mSOFaaci) suplementado con alcohol-polivinílico (PVA), albúmina sérica bovina (BSA) libre de ácidos grasos y suero fetal bovino (FCS). En el primer experimento se valoró el desarrollo, índice de apoptosis, contenido lipídico y ultraestructura de blastocistos bovinos. Para ello, se colectaron ovarios de hembras sacrificadas en matadero, los complejos *cumulus*-ovocito (COC's) fueron madurados, fecundados y luego los embriones se cultivaron *in vitro* en los diferentes sistemas: mSOFaaci + PVA (0,1mg/mL) desde el día 1 (D1) al día (D8), mSOFaaci + BSA (6mg/mL) desde el D1 al D8, mSOFaaci + BSA + 5% FCS desde el día 6 (D6) al D8 y mSOFaaci + BSA (6mg/mL) + 1% FCS desde el D1 al D8. Los porcentajes de blastocistos de D8, fueron más altos ($P < 0,05$) en el grupo de BSA (23,4%), BSA + 5% FCS (20,6%) y PVA (20%), que en BSA + 1% FCS (13,9%). El contenido lipídico, número de blastómeras e índice de apoptosis aumenta con la presencia de suero en el medio de cultivo. Los cortes semifinos y ultrafinos de los blastocistos frescos no mostraron alteraciones ultraestructurales. En el segundo experimento, los blastocistos y blastocistos expandidos PIV del grupo PVA y BSA, fueron vitrificados en *fibreplug*. No se observaron diferencias significativas en las tasas de re-expansión a las 2, 24 y 48 h post-vitrificación, mientras que el índice de apoptosis más bajo (14,7%; $P < 0,05$) correspondió al grupo de blastocistos expandidos cultivados con PVA, valorado a las 2 h después del calentamiento. A nivel ultraestructural, independientemente del estadio y sistema de cultivo (PVA o BSA), se evidenció alteración de las mitocondrias, ausencia de microvellosidades (MV) y aparición de restos celulares en el citoplasma. En el tercer experimento, se evaluó la adición de 50 ng del factor de crecimiento epidermal (EGF) en el protocolo de calentamiento, lo que no produjo ningún efecto sobre la re-expansión y calidad de los blastocistos y blastocistos expandidos del grupo PVA, durante las primeras 24 h post-cultivo. En conclusión, el sistema de cultivo con PVA es capaz de soportar el desarrollo de los embriones bovinos mestizos. El sistema libre de suero que se empleó para producir embriones bovinos *in vitro* debe seguir perfeccionándose para ser empleado en la criopreservación y cubrir los requerimientos y la demanda a gran escala.

Palabras clave: blastocistos, bovino, PIV, vitrificación, ultraestructura.

ABSTRACT

Bovine embryo production is practice worldwide for research and commercial purposes. A major concern of embryo suppliers is the impact of *in vitro* production (IVP) systems on embryo quality and its cryotolerance. The aim of the current study was to evaluate the effect of different culture systems on production and quality before and after vitrification of bovine blastocysts IVP, using the modified synthetic oviduct fluid medium (mSOFaaci) supplemented with polyvinyl-alcohol (PVA), fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) and fetal calf serum (FCS). Experiment 1 assessed the development, apoptosis index, lipid content and ultrastructure of bovine blastocysts. Ovaries were obtained from commercial abattoir. Bovine cumulus-oocyte complexes (COC's) were matured, fertilized and were cultured in *in vitro* culture medium in different systems: mSOFaaci + PVA (0.1 mg/mL) from day 1 (D1) to day 8 (D8), mSOFaa + BSA (6 mg/mL) from D1 to D8 and mSOFaa + BSA (6mg/mL) + 5% FBS from D6 to D8. The blastocysts yield at D8 was higher ($P < 0,05$) in the BSA (23,4%), BSA + 5% FCS (20,6%) and PVA (20%), than in BSA + 1% FCS (13,9%). The lipid content, total number of cells and apoptotic index increased in the presence of serum in *in vitro* culture medium. The semithin and ultrathin sections of fresh blastocysts showed normal morphology. In experiment 2, PIV early and expanded blastocyst of PVA and BSA group were vitrified in *fibreplug*. No significant differences in the re-expansion rates at 2, 24 y 48 hours post-culture, whereas the lowest apoptotic index (14.7%, $P < 0,05$) correspondE to the group of expanded blastocysts cultured with PVA, at 2 hours after thawing. The ultrastructural lesions found, independently of stage of development and system of culture (PVA and BSA) for *fibreplug*-vitrified blastocysts were similar, that affect the mitochondria structure, absence of microvilli (MV) and the appearance of cell debris at cytoplasm. In experiment 3, we evaluated the addition of 50 ng of epidermal growth factor (EGF) in the warming protocol, which no effect on the re-expansion rate and quality of early and expanded blastocysts in PVA group, during the first 24 hours post-culture. In conclusion, the culture system with PVA is capable of supporting of the crossbred embryos development. The serum-free system used in this work to produce *in vitro* bovine embryos should be further improved for use in cryopreservation and meet the requirements and demand at a large-scale.

Keywords: blastocysts, bovine, IVP, vitrification, ultrastructure.

INTRODUCCIÓN

La industria ganadera moderna es el resultado del esfuerzo pionero de dos grupos: los científicos, quienes inicialmente desarrollaron los procedimientos y técnicas de PIV, manipulación y transferencia embrionaria, y por el otro lado, las casa comerciales, quienes modificaron estas tecnologías para hacerlas prácticas y disponibles a la industria bovina y luego a otras especies de interés zootécnico (Hasler, 2014). La producción de embriones bovinos *in vitro* se aplica hoy en día, no sólo en investigación y como modelo para otras especies (humana), sino para obtener descendencia a partir de vacas de alto valor genético; también es útil para un último aprovechamiento de hembras sacrificadas por motivos sanitarios, accidentes o reposición (Van Langendonck *et al.*, 1997).

Desde el nacimiento del primer ternero producto de la transferencia embrionaria de origen *in vitro* (Brackett *et al.*, 1982), se han obtenido grandes avances en el desarrollo de los sistemas de PIV, con nuevos conocimientos relacionados con el metabolismo y ultraestructura (zona pelúcida y organelos citoplasmáticos) en el embrión preimplantacional (Rizos *et al.*, 2003; Urribarrí-Rodríguez *et al.*, 2012) que han permitido la introducción de notables mejoras en los métodos de cultivo. Tras superarse las dificultades iniciales en el desarrollo de la técnica, hoy en día muchos laboratorios producen embriones *in vitro* (Machaty *et al.*, 2012), aunque estos presentan una calidad más baja que los obtenidos *in vivo* (Lonergan *et al.*, 2003).

Hasta la fecha, el mayor obstáculo asociado a la difusión de la tecnología reproductiva *in vitro*, es la falta de métodos eficaces para el conservación de los embriones (Abdalla *et al.*, 2010; Sudano *et al.*, 2011; Sudano *et al.*, 2012). Los conocimientos actuales hacen posible criopreservar con éxito el semen de numerosas especies domésticas de interés; sin embargo, los ovocitos y embriones presentan más problemas que los espermatozoides para sobrevivir a estos procesos. En el caso de los ovocitos, la principal razón de este hecho es el tamaño de la célula y su ratio superficie/volumen, mientras que en el caso de los embriones, los porcentajes de supervivencia son enormemente variables, dependiendo de una gran cantidad de factores como son el estadio de desarrollo, la especie, su origen (*in vivo* o *in vitro*) o el sistema de criopreservación seleccionado (Vajta y Kuwayama, 2006).

A pesar del progreso significativo en la criopreservación de embriones mamíferos, muchos de los eventos moleculares y bioquímicos en los que se basan estas tecnologías no son del todo conocidos (Rizos *et al.*, 2003). Las investigaciones más recientes se centran en la consecución de embriones con mayor calidad. Sin embargo, aún en las condiciones más favorables, cuando se comparan las tasas de preñez de transferencias de embriones frescos contra los vitrificados/calentados se han obtenido solo éxitos limitados. Los índices de gestación tras la transferencia de embriones frescos PIV oscilan en torno al 50%, mientras que estas cifras se reducen de forma brusca cuando los embriones han sido criopreservados (Lonergan *et al.*, 2003; Rizos *et al.*, 2003).

En el caso del ganado bovino, la baja resistencia a la criopreservación de los embriones producidos *in vitro* (EPIV) (y prácticamente nula de las mórulas), condiciona la difusión de esta técnica. Los EPIV, son más susceptibles a los daños causados por la criopreservación (Rizos *et al.*, 2003). De acuerdo con Massip (2003), Lonergan *et al.* (2003), Mucci *et al.* (2006), Pryor *et al.* (2011), la criopreservación representa un desafío para los EPIV, capaz de detectar diferencias en la calidad embrionaria a través de evaluaciones previas a la transferencia embrionaria.

La causa de baja resistencia de los embriones a la criopreservación viene dada por varios factores, que incluyen la calidad, el estadio de desarrollo y la edad del embrión (Abdalla *et al.*, 2010) o bien, la acumulación de lípidos en el citoplasma (Mucci *et al.*, 2006b; Takahashi *et al.*, 2013). Aunque el papel de dichos lípidos no ha sido completamente dilucidado, su retirada parcial o su desplazamiento mejoran la supervivencia de los EPIV a los procesos de congelación/descongelación (Diez *et al.*, 2001). Se cree que su acumulación ocurre como resultado de la adición de FCS en los medios de cultivo (Rizos *et al.*, 2003; Mucci *et al.*, 2006; Barceló-Fimbres y Seidel, 2007), o bien por anomalías del metabolismo energético del embrión (Barceló-Fimbres y Seidel, 2007).

Una vía de reducción de los lípidos embrionarios es la utilización de medios de cultivo que no incluyen suero. Así, su sustitución por BSA o PVA da lugar a la obtención de embriones

con menor cantidad de inclusiones lipídicas y de menor tamaño; los embriones así producidos sobreviven mejor a la criopreservación (Abe *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2008).

Rall y Fahy (1985) fueron los primeros en describir el protocolo de vitrificación para embriones mamíferos. La vitrificación ha sido el método de elección en el caso de los EPIV, puesto que es un método con buenos resultados de supervivencia, simple y además no requiere equipamiento de congelación controlada (Vajta *et al.*, 1998, 2000).

Aunque hoy en día, la criopreservación de EPIV se aborda por técnicas de congelación lenta y por técnicas de vitrificación, permitiendo esta última mejorar la supervivencia embrionaria tras el calentamiento (Martino *et al.*, 1995; Vajta *et al.*, 1998b; 2000; Yu *et al.*, 2010), además de producir menor estrés metabólico en los embriones, dando lugar a mejores tasas de desarrollo y mayores porcentajes de gestación tras su transferencia a hembras receptoras (Vieira *et al.*, 2002).

No obstante, el daño producido por la criopreservación depende de factores como el tamaño y la forma de las células, la permeabilidad de las membranas así como de la calidad y sensibilidad específicas de las blastómeras (Vajta y Kuwayama, 2006). Hasta ahora, son pocos los trabajos publicados que determinen los efectos y las relaciones que puedan establecerse entre los sistemas de cultivo, el número de células de los embriones (Leivas *et al.*, 2011) y su supervivencia a la criopreservación en el caso de los EPIV en animales mestizos.

Las estrategias actuales en el campo de la criopreservación de EPIV, se orientan a: (1) mejora de la calidad embrionaria mediante la utilización de aditivos durante el cultivo de los embriones, o en las soluciones de vitrificación; (2) optimización de los protocolos de vitrificación mediante el diseño de nuevos soportes que permitan la modificación de la relación superficie de la célula/volumen de la solución de vitrificación, y con el fin de lograr un incremento de las velocidades de enfriamiento y calentamiento (gradiente térmico; Seidel, 2006), y (3) adición de factores de crecimiento en el medio de cultivo durante el período de calentamiento, por ejemplo, EGF, hormona de crecimiento (GH),

insulina, activina (Mtango *et al.*, 2003), factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I; Makarevich *et al.*, 2011) o péptidos de origen vegetal que van desde 4 a 10 aminoácidos, llamados peptonas vegetales (George *et al.*, 2006).

Surgen de esta forma métodos como el *cryotip* (Conaghan y Fischer, 2010), dispositivo de vitrificación por microfiltración de membrana (MFMV; Matsunari *et al.* 2010), *cryotop* (Kuwayama *et al.*, 2005; Gutnisky *et al.*, 2013), *fibreplug* (Dinnyés *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2009; Beebe *et al.*, 2011; Asgari *et al.*, 2012; Trigal *et al.*, 2012), o bien, la modificación de las pajuelas abiertas estiradas (*open pulled straws*, OPS) con el empleo de un bloque de hielo sintético (De Leon *et al.*, 2012), las microgotas envueltas en papel aluminio y transferidas a tubos criogénicos (Ghanem *et al.*, 2014), y más recientemente, el uso del VitTrans, dispositivo diseñado para la transferencia directa de embriones bajo condiciones de campo (Morató y Mogas, 2014).

El *fibreplug*, presenta dos ventajas comparado con el sistema tradicional de congelación lenta u OPS. Primero, no requiere de equipamientos o reactivos especiales, y es un método considerado fácil y de rápido manejo; segundo, el volumen de vitrificación es muy bajo, incrementando la velocidad de enfriamiento/calentamiento. Este método de vitrificación ha sido probado de forma exitosa con la preñez de vacas a las que se les han transferido embriones PIV (Trigal *et al.*, 2012).

El desarrollo de estrategias para reducir el estrés asociado con la criopreservación no sólo se centra en la posibilidad de mejorar las condiciones de cultivo asociados a la calidad embrionaria, sino en ofrecer sistemas de crioalmacenamiento que garanticen el desarrollo embrionario post-calentamiento (Elnahas *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, el objetivo general de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes sistemas de cultivo sobre la producción, ultraestructura y criotolerancia de blastocistos bovinos mestizos producidos *in vitro*. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Comparar el efecto de diferentes sistemas de cultivo (mSOFaa + PVA, mSOFaa + BSA y mSOFaa + BSA + FCS) sobre el desarrollo, índice de apoptosis, contenido lipídico y ultraestructura de blastocistos bovinos producidos *in vitro*.
2. Valorar el efecto del proceso de vitrificación sobre la tasa de supervivencia y calidad de embriones bovinos vitrificados producidos *in vitro*.
3. Analizar los efectos del proceso de vitrificación sobre la ultraestructura de blastocistos bovinos producidos *in vitro*.
4. Determinar el efecto de la adición del EGF al medio de cultivo sobre la supervivencia post-vitrificación, e índice de apoptosis de blastocistos bovinos producidos *in vitro*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. PRODUCCION *IN VITRO* DE EMBRIONES BOVINOS

La PIV de embriones bovinos permite la obtención en el laboratorio de un gran número de embriones en el mismo estadio de desarrollo que pueden utilizarse tanto para estudios científicos, como para fines comerciales (Pereira *et al.*, 2005; Sagirkaya *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2009). La optimización de esta técnica ha requerido una profundización en los conocimientos sobre los procesos de maduración, fecundación y cultivo *in vitro* (MIV-FIV-CIV; Sirard *et al.*, 2006). En la actualidad, la recuperación de ovocitos de ovarios reuperados en matadero o de hembras vivas por punción transvaginal guiada ecográficamente (*Ovum Pick-up*) y su posterior CIV, permiten la producción de embriones que pueden ser criopreservados o bien transferidos a hembras receptoras (Pieterse *et al.*, 1991; Looney *et al.*, 1994; Hasler *et al.*, 1995; Donnay *et al.*, 1996; Lazar *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2007; Block *et al.*, 2010).

Hoy en día, son numerosos los equipos que trabajan en la PIV de embriones bovinos en el mundo, estimando que existe una producción anual que supera los 500 mil embriones que van dirigidos a la trasferencia de embriones (Machaty *et al.*, 2012). Como consecuencia, existe una gran cantidad de trabajos de investigación que van desde la evaluación de distintas condiciones y sistemas de cultivo hasta estudios ultraestructurales, tasas de gestación y porcentajes de nacimientos (Crosier *et al.*, 2000; Vanroose *et al.*, 2000; Rizos *et al.*, 2002; Bilby *et al.*, 2006; Barceló-Fimbres y Seidel, 2007; Poehland *et al.*, 2008; Neira *et al.*, 2010; Uhm *et al.*, 2010; Rynkowska *et al.*, 2011; Leivas *et al.*, 2011; Urribarrí-Rodríguez *et al.*, 2012).

El proceso comprende tres pasos fundamentales: maduración *in vitro* de los ovocitos, capacitación de los espermatozoides y fecundación *in vitro* de los ovocitos y el cultivo *in vitro* de los cigotos obtenidos.

1.1. Maduración *in vitro*

El objetivo de los sistemas de maduración *in vitro* es conseguir en el laboratorio que el ovocito siga los mismos cambios que sufre *in vivo* durante el periodo preovulatorio. En

1965, EdwarDE, demostró la capacidad de los ovocitos humanos para madurar *in vitro* cuando eran aislados de los folículos y cultivados en un medio apropiado. Los ovocitos utilizados para la MIV pueden ser obtenidos a partir de hembras vivas o a partir de ovarios de hembras sacrificadas en mataderos.

Las principales técnicas utilizadas para la obtención de ovocitos son:

- a) *Disección de los folículos* (Staigmiller y Moor, 1984), esta técnica permite identificar los folículos no atrésicos. Diversos estudios han demostrado que el diámetro folicular está relacionado con la capacidad del ovocito de madurar, ser fecundado y desarrollarse *in vitro*. Yang *et al.* (1998), en su estudio sobre el control de la maduración de ovocitos de vaca, sugieren que la tasa de maduración, división y desarrollo embrionario son significativamente menores en los ovocitos provenientes de folículos pequeños (<2 mm) que los provenientes de folículos medianos (2-5 mm) y grandes (5-8 mm).
- b) *Aspiración de los folículos*, es el método más utilizado por la rapidez del procedimiento, además de permitir seleccionar los folículos de tamaño concreto (Gordon, 1994).
- c) “*Slicing*” o tasajeo, permite obtener un gran número de ovocitos por ovario, pero al provenir de folículos de diversos tamaños y grados de atresia pueden tener una calidad muy variable (Martino *et al.*, 1995), por lo que se requiere una selección estricta de los ovocitos.
- d) Técnica de punción ovárica guiada por ultrasonografía u *Ovum Pick-Up* (siglas en Inglés, OPU), es una técnica ampliamente utilizada como herramienta para estudiar la dinámica folicular y registrar la capacidad de repetición y la previsibilidad de ondas foliculares. Además de su uso práctico, la OPU ofrece un sistema excelente para estudiar la maduración del ovocito *in vivo* o *in vitro* recuperados bajo varias condiciones fisiológicas (Yang *et al.*, 1998b).

Los ovarios recuperados en matadero contienen folículos de diferente diámetro que presentan en su interior ovocitos en diferentes fases de crecimiento. En la práctica, se utilizan ovocitos provenientes de folículos de 3- 8 mm de diámetro para la producción rutinaria de embriones (Yang *et al.*, 1998b). La apariencia de los folículos también puede

ser útil a la h de seleccionar los ovocitos más viables para la MIV. Entre las características a tomar en cuenta están el aspecto translúcido uniforme y una evidente vascularización. Los folículos atrésicos serán los que presenten una apariencia opaca, grisácea y poca vascularización (Gordon, 1994).

La selección de los ovocitos que se pondrán a madurar es fundamental para la eficacia del proceso. Dicha selección se basa normalmente en criterios morfológicos, en función del tamaño y color del ovocito, el aspecto compacto, el número de capas de células del *cumulus* y homogeneidad del citoplasma (Otoi *et al.*, 1995).

Por otra parte, es importante considerar los medios y las condiciones en los que se llevan a cabo la MIV. Por lo general, los medios de MIV comprenden desde soluciones fisiológicas simples, hasta medios complejos que contienen vitaminas, aminoácidos, purinas, entre otros. Los medios más ampliamente utilizados son medios complejos como Hams F10 y el TCM199 (Hawk y Wall, 1994). La calidad del agua empleada en la preparación de los medios de cultivo es de suma importancia, resaltando el uso insustituible de agua de 18,2 megaohms (Palma, 2001).

En cuanto a las condiciones del cultivo, se debe tomar en cuenta varios aspectos:

-pH y osmolaridad

El pH debe oscilar entre 7,2 y 7,4, y el medio debe ser isotónico con relación a los fluidos naturales de los tejidos (Gordon, 1994). El rango óptimo de la osmolaridad debe oscilar entre 285 y 320 mOsm/kg (Urdaneta, 2005). La medida de la osmolaridad es uno de los controles de calidad imprescindibles en los laboratorios que producen sus propios medios, a fin de evitar los errores de pesado y dilución de los reactivos.

- Atmósfera

La atmósfera es importante para el funcionamiento fisiológico normal de las células y para mantener constante el pH del medio. Un 5% CO₂ en aire saturado de humedad,

proporciona óptimas condiciones para que los procesos de MIV y FIV tengan lugar en condiciones adecuadas (Bavister y Rose-Hellenkant, 1992).

- *Temperatura*

Se debe mantener igual o aproximada a la temperatura corporal fisiológica de la especie a la que pertenecen los ovocitos, 38,5 °C para los bovinos (Gordon, 1994).

- *Suplementación del medio*

El FCS es la fuente proteica más importante en los estudios sobre MIV en bovinos. La adición de suero al medio de maduración previene el endurecimiento de la zona pelúcida y aumenta la capacidad de los ovocitos para ser fecundados y desarrollarse. El suero en la MIV puede actuar vía células del *cumulus* o directamente en el ovocito. Además de fuente de proteínas, el suero también puede contener gonadotropinas: hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) y hormonas esteroideas (17 β estradiol), así como un gran número de factores de crecimiento, los cuales pueden tener un papel importante en la regulación de la maduración ovocitaria (Eppig y Schroeder, 1986).

La presencia de FSH/LH en el medio de MIV, es necesaria como intermediaria de esteroides y factores de crecimiento (Trounson, 1992). Aunque no incrementa la capacidad de los ovocitos para alcanzar el estadio de metafase II, sí parece aumentar la capacidad del complejo *cumulus*- ovocito para producir progesterona y testosterona en el cultivo. Por su parte, el estradiol juega un papel importante en el desarrollo folicular, al sensibilizar las células de la granulosa y estimular la proliferación y diferenciación. El consenso general es el de incluir el estradiol a 1 μ g/mL (Wiemer *et al.*, 1991).

La suplementación de los medios de maduración con el EGF mejora las tasas de maduración nuclear y de división embrionaria (Rieger *et al.*, 1998), así como la suplementación con IGF-I promueve la maduración *in vitro* e incrementa las tasas de formación de blastocistos (Palma *et al.*, 1997) junto con el número de blastómeras (Byrne *et al.*, 2002). El medio de maduración en presencia de EGF en combinación con bajas concentraciones de FSH o LH es capaz de reproducir el efecto inducido por altas

concentraciones de gonadotropinas sobre el desarrollo embrionario, superando el efecto inducido por cada una de las gonadotropinas (Harper y Brackett, 1993).

Por otro lado, Sakaguchi *et al.* (2002), observaron que la suplementación del medio con EGF e IGF-I durante la maduración ovocitaria provoca la disminución del período de tiempo en el que ocurre la extrusión del primer corpúsculo polar en ovocitos provenientes de folículos pequeños. Sin embargo, el EGF es mucho más eficiente en la reanudación de la meiosis en comparación con el IGF-I. Por otro lado, existe evidencia de que el uso de EGF y TGF (del Inglés, *Transforming Growth Factor*) aumenta las tasas de eclosión y de blastocistos (Kobayashi y col., 1994).

Sirisathien *et al.* (2003b), observaron que la suplementación del medio definido con EGF o IGF-I incrementa el número de embriones de 4 células que alcanzan el estadio de blastocistos. En este estudio, el tratamiento con IGF-I produjo un aumento del número de células en la masa celular interna (MCI). De acuerdo a esto, el IGF-I se comporta como un factor de supervivencia embrionaria mediante el incremento celular en la MCI, lo que contribuye a la resistencia embrionaria al estrés calórico (Jousan y Hansen, 2004).

Por otro lado, la incorporación del factor de crecimiento de fibroblastos (siglas en Inglés, FGF) al medio de cultivo incrementa la expresión de transcritos que codifican al interferón tau en blastocistos, molécula responsable del mantenimiento de la preñez por inhibición de la liberación de prostaglandina en el endometrio (Cooke *et al.*, 2009).

- Presencia de las células del cumulus

La presencia de estas células es quizás el principal factor para poder completar satisfactoriamente tanto la maduración nuclear como la citoplasmática (Trounson, 1992; Dey *et al.*, 2012). Su importancia radica en la conocida impermeabilidad de la membrana del ovocito a varios metabolitos de bajo peso molecular (colina, inositol). La cooperación metabólica entre el ovocito y las células del *cumulus* cumple un papel importante durante la maduración. La maduración del ovocito es evaluada a grandes rasgos a través del grado de expansión y la mucificación de las células del *cumulus*, los cambios en las dimensiones del

espacio perivitelino (EP), donde se muestra la extrusión del primer cuerpo polar (CP) y la presencia de la segunda placa metafásica (Gordon, 1994).

La expansión y la mucificación de las células del *cumulus* no implican una adecuada maduración, lo que implicaría que el ovocito no estaría listo para sobrellevar la fecundación de manera correcta (Osborn y Moor, 1985, citado por Gordon 1994). Además, estos autores apuntan que la expansión de las células del *cumulus* puede ocurrir independientemente de la maduración del ovocito. La técnica usada normalmente para evaluar la maduración nuclear incluye la fijación del ovocito desnudo en etanol: ácido acético (3:1) por lo menos 24 h y luego la tinción con lacmoid 1% en una solución de ácido acético al 45% (Villamediana, 1998).

La maduración *in vivo* de ovocitos da como resultado un mayor porcentaje de blastocistos tras la FIV si se compara con la MIV, lo que sugiere que las condiciones *in vitro* no son lo suficientemente adecuadas para un desarrollo óptimo (Izadyar *et al.*, 1998). Existen autores que sugieren que estos porcentajes de blastocistos aumentarían considerablemente si se pone especial atención al periodo inicial, la MIV (Guler *et al.*, 2000; Nagai, 2001; Men *et al.*, 2002; Dode y Adona, 2001; Park *et al.*, 2005; Schoevers *et al.*, 2005; Sagirkaya *et al.*, 2007; Balasubramanian y Rho, 2007). Nagai (2001) y Sutton-MacDowall *et al.*, (2005), proponen que se debe iniciar el diseño de medios nuevos, pero sin descuidar la atención en el animal donador, la morfología del ovocito y las condiciones de maduración.

La suplementación del medio de MIV con inhibidores de fosfodiesterasas (PDE), responsables del incremento de los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMP_c), importante en la regulación de la maduración, pueden llegar a aumentar los porcentajes de blastocistos hasta un 53%, en ovocitos bovinos. Mejor aún, la incorporación al medio de MIV de factores secretados por el ovocito (OSFs), de los cuales el factor de diferenciación de crecimiento 9 (GDF9) y la proteína morfogénica de tejido óseo 15 (BMP15), mejoran su potencial de desarrollo, aumentado hasta un 50 y 58%, respectivamente, la producción de blastocistos PIV e incluso la calidad de los mismos (Gilchrist y Thompson, 2007).

Esto sugiere que los estudios deben estar enfocados al entendimiento del factor detonante de la capacidad de desarrollo del ovocito, que hace referencia a los cambios bioquímicos y moleculares, que lo capacitan para madurar, ser fecundado y llegar exitosamente hasta el estadio de blastocisto (Gilchrist y Thompson, 2007).

1.2. Fecundación *in vitro*

La fecundación es la etapa que asegura la formación de un nuevo individuo a partir de dos gametos, uno masculino y otro femenino. Tras la fusión de los gametos, los dos sets de cromosomas haploides se asocian en el huso mitótico y se produce la primera división mitótica embrionaria. Para que este proceso ocurra satisfactoriamente, varios eventos deben producirse: (i) penetración del espermatozoide a través de las envolturas ovocitarias, (ii) interacción del espermatozoide con la ZP, (iii) fusión ovocito-espermatozoide, (iv) activación del ovocito, (v) descondensación del núcleo espermático y formación de los pronucleos (PN), (vi) desarrollo de los PN masculino y femenino y su migración al centro del ovocito, (vii) asociación de los cromosomas paternos al huso mitótico de la primera división celular (Plachot, 2000).

El macho, donante de los espermatozoides, es un componente importante, ya que se ha observado que los espermatozoides de distintos machos no difieren tan sólo en la capacidad de fecundar ovocitos *in vitro*, sino que también ejercen una influencia sobre el desarrollo embrionario. Estas diferencias podrían deberse a variaciones tanto en la edad de los machos, a la composición del plasma seminal, como a la relación entre el volumen y concentración del eyaculado (Fukui *et al.*, 1998). Las diferencias en los resultados de FIV entre distintos machos pueden acentuarse debido a condiciones subóptimas durante la capacitación y la fecundación *in vitro* (Ambrosini *et al.*, 2006).

Una vez obtenido el eyaculado, tanto de semen fresco como del congelado, deben lavarse los espermatozoides, en el primer caso para eliminar el plasma seminal que contiene sustancias que estabilizan la membrana plasmática del espermatozoide e impiden su capacitación y posterior reacción acrosómica (Bavister, 2002) y en el caso del semen

congelado, para eliminar los crioprotectores y restos del diluyente utilizado. En la bibliografía, numerosas técnicas se han propuesto para lavar el semen y concentrar la fracción de espermatozoides móviles. La más convencional y utilizada es la técnica del *swim-up* o “nado hacia arriba”, pero también han sido utilizados otros métodos como la centrifugación en gradientes de BSA o Percoll[®], o la separación mediante columnas de lana de vidrio o de sephadex (Cesari *et al.*, 2006).

El método más comúnmente utilizado para la capacitación de los espermatozoides es la incubación con heparina. La heparina parece ser un agente capacitante fisiológico, ya que se encuentra en las vías genitales femeninas después de la ovulación y la membrana plasmática de los espermatozoides de rumiantes presentan receptores para ella (Millar y Ax, 1990; citado por Izquierdo, 1996). Bavister (2002), demostró que en el bovino, la heparina es un potente activador de los cambios que se producen durante la capacitación espermática a nivel de la membrana plasmática, estableciendo una correlación entre los niveles de penetración y la concentración de heparina utilizada en el medio de capacitación.

La heparina actúa sobre los espermatozoides durante la capacitación y antes de la reacción acrosómica. Esta sustancia, tras unirse a los espermatozoides, estimularía la pérdida de antígenos de la membrana plasmática y facilitaría tanto la reorganización de la membrana como la alcalinización del pH intracelular y la entrada de Ca^{2+} hacia el interior de la célula, permitiendo al espermatozoide responder a la lisofosfatidilcolina, a las glucoproteínas de la zona pelúcida y a otros activadores de la reacción acrosómica (Izquierdo, 1996).

Después de seleccionar los espermatozoides más móviles mediante algunas de las técnicas mencionadas anteriormente, muchos laboratorios utilizan algún agente químico para estimular y mantener dicha motilidad. La cafeína (Nedambale *et al.*, 2006) y la mezcla de penicilamina, hipotaurina y epinefrina (PHE) son los más empleados (Gordon, 1994). En la etapa de fecundación *in vitro*, las concentraciones de espermatozoides utilizadas varían entre $0,50 \times 10^6$ y 5×10^6 esp/mL (Horvath y Seidel, 2006) o de 1×10^7 (Nedambale *et al.*, 2006a). El uso de estas concentraciones de espermatozoides tiene una influencia

significativa en la proporción de ovocitos que se unen con los espermatozoides, se segmentan y alcanzan el estado de blastocisto (Ward *et al.*, 2002).

En condiciones *in vivo*, la fecundación del ovocito ocurre cuando la relación espermatozoide:ovocito es cercana a 1:1 (Frei, 2004), en contraste con la situación *in vitro*, donde la concentración de espermatozoides utilizada permite obtener una relación de 10.000:1 (Ward *et al.*, 2002). Los ovocitos incubados con una alta concentración de espermatozoides en un volumen relativamente reducido de medio de fecundación, están expuestos a la acción de las enzimas hidrolíticas liberadas por los espermatozoides muertos, lo que puede tener un efecto perjudicial en su potencial desarrollo, por lo que la duración de co-cultivo de los gametos no debería de sobrepasar el tiempo necesario para que se produzca la máxima penetración (Gordon, 1994).

En bovinos, a medida que aumentan las h de co-cultivo de los gametos también aumenta la poliespermia ya que a las 16 h hay una poliespermia del 3% *versus* los expuestos por 1 h (Frei, 2004). Se ha establecido que la reducción del tiempo de co-cultivo de los gametos favorece la obtención de embriones de mejor calidad (Kochhar *et al.*, 2003).

Al reducir el tiempo de co-cultivo de 20 a 5 h se lograría una disminución en los porcentajes de segmentación de un 85% a un 20% respectivamente (Sumantri *et al.*, 1997). En bovinos, al reducir el tiempo de co-cultivo de los gametos disminuyen las tasas de desarrollo, pero se obtienen embriones de mejor calidad (Kochhar *et al.*, 2003). El co-cultivo de los gametos bovinos durante 10 h genera una mayor efectividad en las tasas de segmentación comparado con tiempos de 5 y 1 h, además mejora la eficiencia en la producción de blastocistos (Ward *et al.*, 2002).

El medio y los protocolos utilizados para la producción de embriones son diferentes de un laboratorio a otro y son la principal fuente de la variación de los programas de FIV (Nedambale *et al.*, 2006a). Los medios de fecundación *in vitro* han sido formulados con el propósito de favorecer las condiciones para la capacitación espermática y la fecundación de los ovocitos madurados (Nedambale *et al.*, 2006). Los medios empleados en esta etapa

suelen basarse en la composición del plasma sanguíneo (Hank's, TCM 199) o simplemente son variantes de medios salinos (TALP, DM, krebs-Ringer).

En los rumiantes los medios de capacitación y fecundación más utilizados son el medio Tyrodes suplementado con albúmina, lactato, piruvato (TALP; Vieira *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2006; Sagirkaya *et al.*, 2007) y el medio Bracket y Oliphant (BO; Nedambale *et al.*, 2006), descrito para la capacitación de espermatozoides de conejo y modificado por diversos autores para adecuarlo a las condiciones de distintas especies, en bovino: Nedambale *et al.* (2006), Hernández-Fonseca *et al.* (2002), denominado medio definido modificado (mDM).

1.2.1. Valoración de la Fecundación

La gestación y el nacimiento de un individuo es el parámetro ideal para establecer la eficacia del sistema de fecundación empleado. No obstante, llevar a cabo este sistema de evaluación es costoso, ya que es necesario mantener en perfectas condiciones a las hembras receptoras y dependiendo de la especie utilizada, se ha de esperar demasiado tiempo para obtener resultados. Por estas razones, también suelen utilizarse parámetros indirectos de evaluación de la eficacia del proceso, como la observación de dos corpúsculos polares, la segmentación normal y desarrollo del ovocito inseminado y del estado del material nuclear mediante tinciones específicas (Vandaele *et al.*, 2006).

A diferencia de lo observado en ovocitos de otras especies (ratón, humano) en rumiantes, debido a la presencia de gotas lipídicas y otros pigmentos, los pronúcleos no son visibles en microscopio óptico de contraste de fases, a menos que se utilicen tinciones especiales, lo que requiere períodos de fijación prolongados (por lo menos 24 h) y el análisis en detalle, del estatus nuclear y otras características del ovocito (Asada y Fukui, 2000).

1.2.2. Anomalías de la Fecundación *in vitro*

Las anomalías más comunes para la FIV son la asincronía en el desarrollo de los pronúcleos y la penetración del ovocito por más de un espermatozoide, es decir, la poliespermia (Hyttel *et al.*, 2000). La asincronía en el desarrollo de los pronúcleos normalmente suele ser debida a un error en la formación o crecimiento del pronúcleo masculino. La incapacidad del ovocito para formar el pronúcleo masculino puede ser causada por la ausencia del factor de crecimiento del pronúcleo masculino (siglas en Inglés, MPGF), debido a una maduración citoplasmática deficiente, o la omisión de LH del medio utilizado para la fecundación (Ijaz y Hunter, 1989; citado por Izquierdo, 1996),.

La penetración poliespermática durante la fecundación *in vitro* de ovocitos madurados tanto *in vivo* como *in vitro*, parece ser debida a una falla en la exocitosis de los gránulos corticales. La poliespermia se ha asociado con la fecundación de ovocitos tanto inmaduros, debido a la incorrecta exocitosis del contenido de dicho gránulos, como sobremadurados, por una disminución de la efectividad de los enzimas corticales sobre la zona pelúcida (Izquierdo, 1996). En ovocitos bovinos madurados y fecundados *in vitro* el porcentaje de polispermia no supera el 10% (Kawarsky *et al.*, 1996).

Por otra parte, la partenogénesis se define como la producción de un embrión, con o sin desarrollo final de un individuo adulto, a partir de un gameto femenino y sin ninguna contribución del gameto masculino. Los estados tempranos de partenogénesis pueden ser inducidos artificialmente o pueden ocurrir espontáneamente en una amplia variedad de mamíferos. En bovinos, aparece cerca de un 9% de ovocitos partenogenéticos, sin previo tratamiento de activación (Wang *et al.*, 2008).

La poliginia es una anomalía producida por la falla en la extrusión del primer o segundo corpúsculo polar o por la fragmentación del pronúcleo femenino que da como resultado un cigoto con un grupo extra de cromosomas femeninos (Gordon y Lu, 1990). Esta anomalía, parece estar relacionada con la fecundación de ovocitos tanto inmaduros como sobremadurados (Izquierdo, 1996). Análisis citogenéticos han demostrado que cerca del 50% de los casos, los ovocitos son haploides, sugiriendo un origen partenogenético. Los

ovocitos con un solo pronúcleo pueden ser también el resultado del desarrollo asincrónico del pronúcleo (con un segundo pronúcleo apareciendo pocas h después), en casos muy raros se da la fusión de pronúcleos (Plachot, 2000).

Por otro lado, la aparición de cigotos trinucleares puede tener su origen digénico o diándrico. En el caso digénico, el set de cromosomas extra es de origen materno y es el resultado de la fecundación de un ovocito diploide (no hubo reducción de su carga cromosómica) por un espermatozoide normal (haploide). Contrariamente, el set de cromosomas extra, en el caso del diándrico, es de origen paterno, resultado de la fecundación polispérmica (Plachot, 2000).

1.3. Cultivo de *in vitro* de embriones

El CIV constituye la última y más larga etapa en el proceso de producción de embriones. En el caso del ganado bovino, los embriones son mantenidos entre 7 y 8 d, en un medio que debe proporcionarles las mejores condiciones para su crecimiento, favoreciendo la división celular y el normal desarrollo hasta la formación del blastocelo (BC), durante la blastulación. La utilización de diversos medios de cultivo tiene un efecto significativo sobre la calidad del embrión (Lonergan *et al.*, 2003). Estas condiciones de cultivo se traducen en la producción de embriones sustancialmente diferentes a los que obtenemos tras la superovulación y lavado de hembras donantes (Corrêa *et al.*, 2008).

El estudio, durante las últimas dos décadas, de la concentración idónea de iones, cationes y sustratos metabólicos necesarios para el desarrollo de embriones preimplantacionales, ha dado lugar a la formulación de medios de cultivo que incorporan suplementos o factores que mejoran el desarrollo embrionario (Wang y Sun, 2006; Gilchrist y Thompson, 2007). No obstante, la capacidad de los embriones para desarrollarse en un medio concreto no es necesariamente un indicativo de una preferencia por un ambiente determinado, sino que puede ser también reflejo de su capacidad adaptativa ante unas condiciones artificiales subóptimas (Ward *et al.*, 2000; Wang y Sun, 2006).

En muchas situaciones, una reducción en la competencia para el desarrollo y condiciones subóptimas de cultivo se combinan para producir un retraso en los embriones, anomalías en el desarrollo y una reducción de la viabilidad (Feugang *et al.*, 2009). Los factores críticos para la supervivencia de los embriones bovinos son varios y entre ellos se encuentran:

-Temperatura y luminosidad

La temperatura de incubación de los embriones está determinada por la temperatura fisiológica del animal. En bovinos se ha observado un mayor número de blastocistos en un intervalo de 37 y 39 °C y un aumento de la temperatura por encima de 39 °C, compromete el desarrollo de los embriones (Sugimaya *et al.*, 2003). La exposición de los embriones a la luz en forma repetida o durante varios espacios de tiempo y más aún a la luz ultravioleta, afecta negativamente a todas las etapas de desarrollo de los embriones debido a la producción de radicales de superóxido (Nakayama *et al.*, 1994).

-Atmósfera

La atmósfera más utilizada en los laboratorios de FIV para el cultivo de embriones de bovinos es: 5% de CO₂ en aire saturado de humedad (Balasubramanian y Rho, 2007) y 5% de CO₂, 5% O₂, 90% N₂ (Lim *et al.*, 2007). El metabolismo embrionario también parece estar influido por la tensión de O₂. Este puede generar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el cultivo de embriones, manifestando sus efectos dañinos directamente sobre el DNA, la peroxidación de lípidos y la modificación oxidativa de proteínas (Van Soon *et al.*, 2002).

-pH y la presión osmótica

Son muchos los laboratorios que emplean el hidroxietilpiperazine ácido N-2-etaesúlfico (HEPES) como solución tampón en los medios de cultivo (Sagirkaya *et al.*, 2007). La incorporación de este compuesto mejora la calidad tamponadora en varios medios, como en el medio sintético de fluido oviductal (SOF) y en ocasiones, el HEPES puede ser sustituido por el bicarbonato sódico. El SOF es una solución salina relativamente simple que contiene además piruvato, lactato, glucosa y antibiótico. Este medio fue

formulado por Tervit *et al.* (1972), aunque posteriormente, su composición fue modificada por Takahashi y First (1992). Actualmente, este medio es utilizado para el cultivo de embriones bovinos (Feugang *et al.*, 2009; Sudano *et al.*, 2011). Los embriones sufren rápida contracción y expansión como resultado de ligeros cambios en la concentración de sales de los medios. Si la osmolaridad del medio es menor a la del ambiente uterino, el embrión absorberá agua y se hinchará hasta explotar, y al contrario, si la osmolaridad es mayor, el tamaño del embrión se encogerá lo cual también es detrimental para la supervivencia del mismo. De acuerdo a las secreciones uterinas, se asume que el rango óptimo se encuentra entre 285 y 320 mOsm/kg (Urdaneta, 2005). Aunque existe evidencia que valores de 245 mOsm/Kg favorecerían el desarrollo embrionario (Duque *et al.*, 2003).

-Suplementación del medio:

Aunque los embriones bovinos pueden ser cultivados *in vitro* en un medio simple bajo condiciones definidas, la suplementación con suero o BSA ha demostrado ejercer un efecto beneficioso sobre el desarrollo embrionario. Embriones en ausencia de proteínas exhiben diferencias en su actividad metabólica, una baja capacidad de desarrollo y bajo número de células, comparada con los embriones cultivados en presencia de proteína (Duque *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2007).

Cada vez es más frecuente la utilización de medios químicamente definidos para la PIV de embriones bovinos. Quizás la mayor ventaja de la adopción de estos medios es que permite obtener resultados de mayor repetibilidad, además de garantizar un mayor control de los agentes infecciosos en los componentes de origen biológico (BSA y suero) que son empleados de manera rutinaria en los laboratorios de FIV (Hernández-Fonseca *et al.*, 2002), razón por la que se reduce el uso de albúmina a favor de macromoléculas sintéticas como el PVA (Orsi y Leese, 2004).

La sustitución de BSA por PVA, en la etapa de cultivo en los embriones bovinos PIV, muestra diferencias relativamente bajas en la tasa de desarrollo, eclosión, número de blastómeras (Lonergan *et al.*, 1999) y la viabilidad después de la vitrificación (Krisher *et al.*, 1999). Estos resultados están asociados con un incremento en el consumo de piruvato y

un descenso en el consumo de oxígeno (Eckert *et al.*, 1998). Las tasas de producción de embriones bovinos podrían mostrar un incremento, en presencia de PVA, si el medio está suplementado con myo-inositol y citrato (Carney y Foote, 1991).

La función del PVA se extiende más allá de proporcionar nutrientes pero se sabe muy poco acerca de sus efectos biológicos, sin embargo con soluciones crioprotectoras ofrece mayor estabilidad a la membrana plasmática de ovocitos congelados. En embriones, es posible que este sea absorbido por endocitosis y puede tener un efecto directo en el embrión pero puede no ser apreciable hasta después de la transferencia, aunque es bien conocido que ofrece condiciones ideales de osmolaridad y pH al medio (Orsi y col., 2004).

Uno de los mayores papeles biológicos de la BSA es la captación de iones y de pequeñas moléculas, protegiendo a los embriones de ciertos tóxicos existentes en el medio, además sirve como reservorio de muchos componentes, como esteroides, vitaminas, ácidos grasos y colesterol. El hecho de que la albúmina forme complejos con iones metálicos, proporciona a esta macromolécula un efecto protector de los embriones a los efectos tóxicos de los superóxidos. Por otro lado, también es necesaria la presencia de macromoléculas para el cultivo de los embriones. Esto suele ser solucionado con la adición de BSA, ya que la presencia de macromoléculas en el medio de cultivo parece proporcionar mejores resultados de desarrollo de los embriones hasta blastocisto que otras macromoléculas como la polivinilpirrolidona (PVP; Mucci *et al.*, 2006).

El FCS, otro suplemento sérico, es empleado de manera rutinaria en el cultivo de embriones bovinos. Este suero contiene proteínas, aminoácidos, carbohidratos, elementos traza, hormonas, factores de crecimiento y vitaminas; así como, componentes indefinidos promotores del crecimiento, como la fetuína, que están ausentes del suero procedente de animales adultos. La composición y concentración de sus componentes varía en función del animal donante y del momento de su recolección, por lo que su adición al medio de cultivo, además de alterar su composición original, es una fuente de variación muy importante (Mucci *et al.*, 2006).

El uso del suero en los medios de cultivo de embriones se ha asociado con la aparición del síndrome del becerro gigante (Lazzari *et al.*, 2002) y otras anormalidades como la modificación de organelos celulares, degeneración de mitocondrias (Abe *et al.*, 2002), formación prematura de BC y modificación en la expresión de genes (Rizos *et al.*, 2002; 2003). También es fuente de algunos virus patógenos, provoca excesiva acumulación de lípidos (Barceló-Fimbres y Seidel., 2007) y de la baja supervivencia de los embriones después de la criopreservación (Mucci *et al.*, 2006).

El suero actúa de manera bifásica en el desarrollo embrionario, ya que causa la inhibición del desarrollo cuando se añade antes de la primera división embrionaria, mientras que estimula la compactación de la mórula y la formación de blastocistos cuando se añade en etapas más tard (Bavister y Rose-Hellekant, 1992). Al mismo tiempo, su empleo se ha relacionado con una aceleración del desarrollo embrionario (Gómez y Díez, 2000), que podría ser debido a las vitaminas, ácidos grasos y factores de crecimiento existentes en el suero y que pueden ser esenciales en las últimas etapas del desarrollo (Bavister, 2000; Lazzari *et al.*, 2002; Feugang *et al.*, 2009).

Se han publicado varios estudios en los que ambos suplementos séricos (BSA ó FCS) producen porcentajes similares de desarrollo hasta blastocisto, sin embargo, la calidad de los embriones y el número de blastómeras fue superior en el medio con suero (Thompson, 2000; Orsi y Leese, 2004; Lim *et al.*, 2007; Gómez *et al.* 2008; Leivas *et al.*, 2011). El suero es considerado un compuesto variable e indefinido (Gardner y Lane, 1998), lo cual genera variaciones en la composición de los medios utilizados e interfiere con la repetibilidad de los resultados obtenidos (Mucci *et al.*, 2006).

2. CARACTERÍSTICA DE LOS EMBRIONES BOVINOS PIV

Es difícil determinar si el bajo rendimiento de la técnica de PIV (30-40% de blastocistos, con relación al número de ovocitos MIV) es debido directamente a condiciones subóptimas de cultivo o si es el resultado de una reducción de la competencia en el desarrollo de los ovocitos madurados y fecundados *in vitro*, ya que parece ser que existen factores

moleculares, celulares o genéticos, intrínsecos al ovocito y al embrión, determinantes del potencial de desarrollo (Lonergan *et al.*, 2006), que se traducen en el detenimiento de la división embrionaria y el bloque del cuarto o quinto ciclo celular (Warzych *et al.*, 2007) o bien, fallas de la gestación temprana en hembras sometidas a TE (Chenoweth, 2007).

2.1. Morfología

Los EPIV tienen una velocidad de desarrollo diferente y poseen un citoplasma más oscuro y una densidad menor como consecuencia del alto contenido de lípidos, aspecto muy relacionado con el medio de cultivo (Lim *et al.*, 2007), así mismo, presentan menor número de células, proporcionalmente una menor MCI, un incremento de la cantidad de vacuolas en el citoplasma, menor cantidad de uniones intercelulares entre blastómeras (Iwasaki *et al.*, 1990) y una ZP más frágil (Dubby *et al.*, 1997). Se han detectado anomalías cromosómicas (principalmente aneuploid) en varios estadios celulares de los embriones obtenidos *in vitro*, desde el ovocito hasta el blastocisto, las cuales son responsables de la fecundación, la división mitótica anormal, y de la mortalidad embrionaria (Iwasaki *et al.*, 1990).

Por otra parte, en un estudio reciente, se ha mostrado que los embriones de equinos, porcinos, ovinos, caprinos y bovinos obtenidos *in vitro*, presentaron una mayor incidencia en la tasa de apoptosis en comparación con sus homólogos obtenidos *in vivo* (Pomar *et al.*, 2005; Lonergan, 2006; Wang *et al.*, 2008), así como una mayor sensibilidad de la ZP a la acción de la pronasa. El desarrollo de técnicas de tinción diferencial ha permitido determinar la calidad de los blastocistos en función del número de células y de su distribución en la MCI y el TE (Lim *et al.*, 2007).

Aunque el número de células totales de los EPIV es comparable al de los obtenidos *in vivo*, su distribución y patrón de diferenciación presenta diferencias, con un número de células en la MCI significativamente más bajo en el caso de los EPIV (Iwasaki *et al.*, 1990). La suplementación de los medios de cultivo con suero se ha relacionado con la acumulación

anormal de gotas lipídicas intracitoplasmáticas (Abe *et al.*, 1999; Mucci *et al.*, 2006; Sudano *et al.*, 2011).

2.1.1. Gotas lipídicas

La presencia de estas estructuras en los embriones bovinos PIV se ha asociado a su alta sensibilidad a los procesos de criopreservación en general, y en los desarrollados en medios de cultivo suplementados con suero (Mucci *et al.*, 2006). La estructura de las gotas lipídicas consiste en una monocapa de fosfolípidos que separa la fase acuosa e hidrofóbica de la célula. En su interior alberga lípidos neutros, siendo los principales los triacilglicérols (TAG) y estéres de estero. Los TAG son la principal reserva energética celular, y en conjunto con los estéres de estero son reservorio de componente de la membrana lipídica (Walther y Farese, 2009; Suzuki *et al.*, 2011).

Entre las proteínas identificadas, asociadas a las gotas lipídicas, se encuentran: la familia PAT (del Inglés, *Perilipin Amino-terminal*) (Suzuki *et al.*, 2011), Acil CoA diacilglicerol aciltransferasa 2 (DGAT2), una enzima encargada de catalizar la síntesis de TAG a partir de diacilglicerol (DG) (Kuerschner *et al.*, 2008); y caveolina, una proteína que podría estar relacionada con la lipólisis de los TAG (Olofsson *et al.*, 2009). Se ha determinado que el contenido de gotas lipídicas citoplasmáticas está regulada por la función de dos proteínas, de la familia PAT, denominadas Perilipin Cola-Alipofílica 2 y 3 (*PLIN2* y *PLIN3*) (Skinner *et al.*, 2009).

Los resultados del estudio de Sastre *et al.* (2014), indican que *PLIN2* podría estar implicada en la mantenimiento de las reservas de lípidos necesarios para apoyar el desarrollo del embrión después de la fecundación de ovocitos bovinos MIV, mientras que *PLIN3*, es la proteína responsable de la estabilización y secuestro de gotas lipídicas recién sintetizadas en el citoplasma de los blastocistos bovinos PIV.

Varios autores redujeron la extracción de lípidos en embriones bovinos PIV mediante la incubación con citocalasina (estabilizador del citoesqueleto por inhibición de la

polimerización de filamentos de actina), centrifugación y remoción por microcirugía, observando un mayor porcentaje de supervivencia pos-criopreservación en los embriones libres de gotas lipídicas (Murakami *et al.*, 1998; Ushijima *et al.*, 1999; Díez *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que la acumulación de lípidos intracelulares comienza a disminuir a partir del estadio de mórula, coincidiendo con la aparición de mitocondrias maduras (Abe *et al.*, 1999), pudiendo cumplir de este modo, la función de reserva para los momentos de gran demanda energética, como lo es la formación del BC. Por el contrario, en presencia de suero, la acumulación lipídica aumenta a partir de este estadio (Ferguson y Leese, 1999).

El origen de la acumulación de las gotas lipídicas intracitoplasmáticas en los embriones bovinos PIV parece tener respuesta en alguna de estas tres teorías: 1) la presencia de suero genera un defecto deletéreo sobre la estructura mitocondrial, lo cual al producir alteraciones morfológicas y funcionales en esta organela, provocaría una acumulación anormal de gotas lipídicas producto de alteraciones en su metabolismo (Dorland *et al.*, 1994). Plante y King (1994), reportaron que las mitocondrias fueron las organelas que mostraron las mayores modificaciones durante el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos, al encontrar una asociación entre estos cambios y el incremento del metabolismo en estos embriones, el cual se refleja en un aumento en las tasas de consumo de O₂ y de producción de CO₂. 2) La acumulación podría estar mediada por las blastómeras (y su gran capacidad de captación de ácidos grasos, fosfolípidos y triglicéridos) al incorporar lipoproteínas presentes en el suero (Abe *et al.*, 1999). 3) La acumulación de lípidos se debe a una alteración en el metabolismo energético, ocasionado por un exceso del metabolismo de la glucosa vía glucólisis, con inhibición de la fosforilación oxidativa (Bavister y Rose-Hellekant, 1992).

Recientemente, Camargo *et al.* (2008), propone que en embriones bovinos PIV, al igual que lo reportado para células somáticas, es posible que exista un nexo entre el nivel de glucosa metabolizada a través de la vía pentosa fosfato (PF) y el nivel de expresión de ciertos genes lipogénicos y en consecuencia la acumulación de lípidos. Adicionalmente, en algunos embriones hembra PIV, se registra un retardo en la normal inactivación de uno de sus cromosomas X, lo cual se traduciría en una doble actividad de los genes allí ubicados, entre

ellos el de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). En consecuencia, la sobrerregulación de la vía PF, a consecuencia de la doble dosis de su enzima limitante (G6PD) y en presencia de elevados niveles de glucosa, estaría conduciendo a una mayor acumulación de lípidos en los embriones hembra (Camargo *et al.*, 2008).

Esta última propuesta toma más fuerza al revisar la hipótesis de Camargo *et al.* (2008), que postula que en presencia de glucosa, la abundancia relativa de RNAm de los genes lipogénicos acetil-CoA carboxilasa (ACACA) y sintetasa de ácidos grasos (FASN) de los embriones bovinos PIV, es mayor en hembras que en machos, lo cual afecta su contenido lipídico. En resumen, la presencia de carbohidratos incrementaría la concentración de xilulosa-5fosfato (Xu-5P), a su vez esta activaría la proteína fosfatasa 2A (PP2A), la cual actuaría sobre la proteína de unión al elemento que responde a los carbohidratos (chREBP), quien finalmente induciría en el núcleo la expresión de genes que codifican para enzimas lipogénicas promoviendo, por lo tanto, la conversión de carbohidratos en grasa (lipogénesis).

Los argumentos que sustentan esta hipótesis son los siguientes: el gen de la G6PD, la enzima que se encuentra a la entrada de la vía de la PF y que controla el flujo y el rendimiento a través de esta vía, se ubica en el cromosoma X. Los embriones hembra, por lo tanto, tienen el potencial para producir una cantidad doble de esta enzima (y de otras ubicadas en el mismo cromosoma), en comparación con los embriones macho, los cuales tienen solo un cromosoma X (revisado por Gutiérrez-Adán *et al.*, 2006).

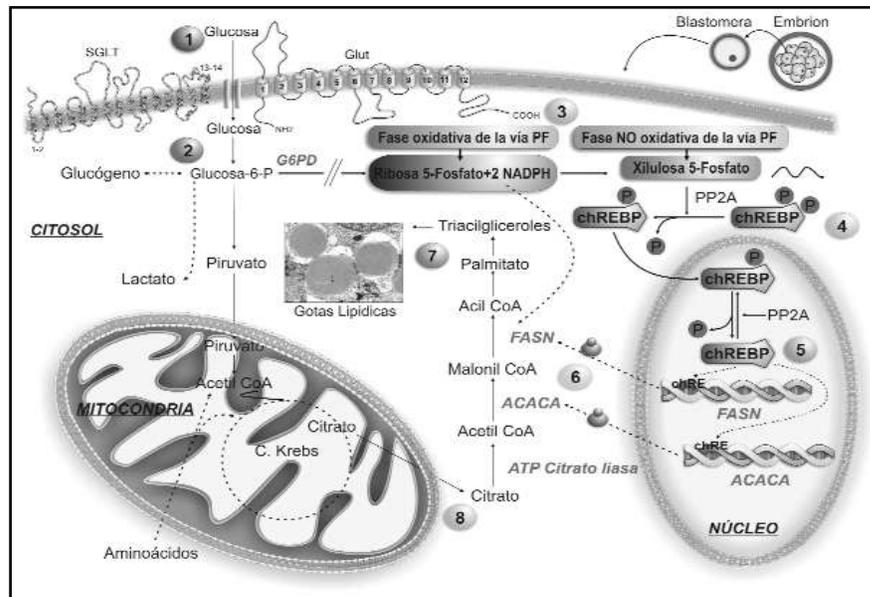


Figura 1. Modelo de la producción de gotas lipídicas en una blastómera de embrión bovino. Tomado de Camargo *et al.* (2008).

Otro grupo de investigadores señalan que ocurre un desbalance en los procesos de óxido-reducción celular, afectando el metabolismo de las mitocondrias e impidiendo el metabolismo de los complejos lipídicos a través de la β -oxidación (Barceló-Fimbres y Seidel, 2007). Barceló-Fimbres y Seidel (2007a), proponen el uso del etosulfato de fenazina (PES) en los medios de cultivo de embriones bovinos, por ser un regulador metabólico que inhibe la síntesis de ácidos grasos y favorece la vía de la pentosa-fosfato, que oxida el NADPH a NADP⁺.

Sudano *et al.* (2011), afirman que la adición de PES a los medios de cultivo reduce efectivamente el incremento de lípidos intracitoplasmáticos en los EPIV. Barceló-Fimbres y Seidel (2007a), reportan que la adición de PES en el medio de cultivo el día 2,5 post-inseminación, produce un efecto beneficioso sobre la supervivencia embrionaria después de la congelación lenta y la vitrificación. Del mismo modo, la L-carnitina (LC), otra sustancia química moduladora de lípidos, además de mejorar el desarrollo embrionario temprano (Takahashi *et al.*, 2013), mediante utilización de lípidos, principalmente a través de la β -oxidación (Sutton-McDowall *et al.*, 2012). Hasta ahora es posible contar con estos dos

productos por sus beneficios sobre la calidad y criotolerancia en el embrión, e incluso por sus efectos sobre los genes que regulan el metabolismo de lípidos (Ghanem *et al.*, 2014).

2.2. Metabolismo de los embriones preimplantacionales PIV

El metabolismo cumple dos funciones, la primera para proporcionar energía requerida por las células para mantener su homeostasis intracelular y apoya funciones especializadas, y la segunda, el suministro de metabolitos para biosíntesis de constituyentes celulares. En cuanto a los embriones preimplantacionales, más atención se ha dedicado a la primera que a la segunda función, dado a los sustratos principales que son añadidos a los medios de cultivo de los embriones: piruvato, glucosa, lactato y aminoácidos (Leese, 2012).

Durante los primeros estadios, antes de la activación del genoma embrionario, los embriones utilizan preferiblemente piruvato, lactato y glutamina como fuente de energía, aumentando considerablemente la utilización de la glucosa en estadios más avanzados de desarrollo (Rieger *et al.*, 1992; Gardner y Lane, 1998; Thompson, 2000). La falta de utilización de la glucosa durante los primeros estadios estaría dada por la falta de actividad de la enzima fosfofructoquinasa. Esta enzima acelera la glucólisis catalizando la formación de fructosa 1-6 bifosfato a partir de glucosa 6-fosfato, y se encuentra controlada alostéricamente por el cociente adenosín trifosfato – adenosín difosfato (ATP-ADP), particularmente alto en este período (Gardner *et al.*, 1994).

En esta etapa, la adición de la glucosa a los medios de cultivo no solamente no sería aprovechada, sino que, a su vez, generaría un efecto inhibitorio sobre el desarrollo embrionario (Takahashi y First, 1992). Sin embargo, en embriones bovinos a partir del estadio de 8-16 células y en respuesta a una alta demanda de energía necesaria para la compactación, y la formación y expansión del BC, el cociente de ATP-ADP podría disminuir, y con ello, la inhibición ejercida sobre la enzima mencionada con lo cual aumentaría el consumo de glucosa. Este metabolito también participa en la síntesis de precursores de ácidos nucleicos y de lípidos (Gardner y Lane, 1998) y su disponibilidad sería importante durante la eclosión fuera de la ZP (Menezo y Khatchadourian, 1991).

En el bovino, se ha comprobado que el metabolismo del piruvato y la glutamina permanecen elevados en los embriones de 2-4 células y va disminuyendo hasta la formación del BC, momento a partir del cual la oxidación de la glutamina, mediante el ciclo de Krebs, incrementa muy marcadamente mientras que el metabolismo del piruvato se ve aumentado ligeramente. La disminución del metabolismo de la glutamina se traduce en un descenso de la concentración intracelular de ATP que reduciría el efecto inhibitorio de la fosfofructoquinasa y, consecuentemente, permitiría el incremento del metabolismo anaerobio de la glucosa (Rieger *et al.*, 1992).

Los aminoácidos, además de ser imprescindibles para la síntesis proteica, también pueden actuar como precursores para la síntesis *de novo* de ácidos nucleicos, como precursores de los fosfolípidos y como substrato energético, ya que se ha observado que el uso de un medio simple químicamente definido que contenga aminoácidos, pero no glucosa ni fosfato, permite el desarrollo embrionario preimplantacional (Trounson *et al.*, 1994).

Con respecto a los lípidos, poco se sabe acerca de la importancia que tendrían en su uso como fuente energética durante el desarrollo embrionario temprano (Thompson, 2000). Sin embargo en los últimos años se ha debatido la posibilidad de mejorar la viabilidad de los embriones criopreservados a través de la adición de ciertos componentes lipídicos a los medios de cultivo, específicamente ácido linoléico no como fuente de energía sino como fluidificador de la membrana plasmática (Hochi *et al.*, 2001).

2.3. Expresión del genoma embrionario

Durante los primeros estadios de desarrollo embrionario, ocurren eventos cruciales para el desarrollo normal. Estos incluyen la combinación de los genomas paternos, alteración de las vías generadoras de energía, la activación de mecanismos homeostáticos intracelulares y la reorganización del citoplasma y organelas (Bavister, 2000).

El control de la expresión de genes durante la fase preimplantacional es particularmente importante. Los eventos que se desarrollan durante este periodo, incluyen: a) la primera

división celular, b) activación del genoma embrionario, c) la compactación de la mórula, momento en que se establece el primer contacto íntimo célula-célula en el embrión temprano y d) la blastulación, que supone la diferenciación de dos tipos celulares, la masa celular interna (MCI) y el trofoectodermo (TE) (Lonergan *et al.*, 2006).

El desarrollo embrionario *in vitro* experimenta un bloqueo que en el caso del ganado bovino se manifiesta en el cuarto ciclo celular (Warzych *et al.*, 2007). Este bloqueo coincide con el inicio de la activación del genoma embrionario y la transcripción de nuevo RNAm (Sagirkaya *et al.*, 2007). La razón de esta alteración del desarrollo puede ser debida a un agotamiento o ausencia de factores de transcripción o a daños causados por inadecuadas condiciones ambientales (Meirelles *et al.*, 2004). La síntesis proteica y la acumulación de transcritos de RNAm durante el desarrollo del ovocito son determinantes para la activación y posterior desarrollo embrionario (Figura 2) (Lonergan *et al.*, 2003).

Recientemente, existe la tendencia de usar el patrón de expresión de RNAm como un criterio para predecir el potencial de desarrollo de embriones producidos *in vivo* e *in vitro* (Sirard *et al.*, 2006). Existen estudios que han demostrado que la abundancia relativa de varios transcritos de RNAm son afectados por la selección del medio y la fuente proteica que se usa como suplemento (Lonergan *et al.*, 2003; Stinshoff *et al.*, 2011) e incluso la criopreservación (Dhali *et al.*, 2009).

Otra de las condiciones de cultivo, como la alta tensión de oxígeno, responsable del estrés oxidativo, ha recibido especial atención (Van Soom *et al.*, 2002; Corrêa *et al.*, 2008). La alta tensión de oxígeno puede ser perjudicial para el desarrollo embrionario, haciéndolo responsable de la pobre calidad de los embriones PIV, probablemente por la acumulación de ROS, llegando a alterar funciones celulares importantes en la que se incluye la expresión de varios genes (Lonergan *et al.*, 2003).

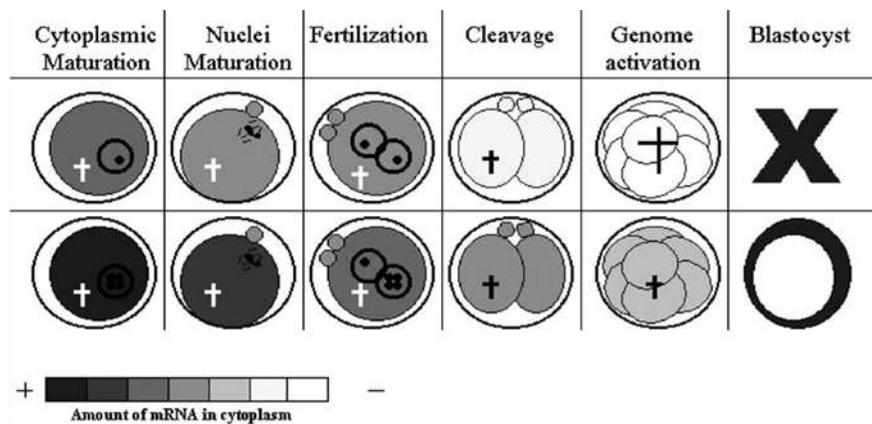


Figura 2. Representación esquemática de la cantidad de RNAm correspondiente a ovocitos de baja (línea de arriba) y moderada (línea abajo) calidad, mostrando el decaimiento de la cantidad de RNAm a medida que el embrión avanza hasta el estadio de blastocisto. La equis al final de la línea de arriba representa el bloqueo de desarrollo embrionario (tomado de Meirelles et al., 2004).

Específicamente, los genes relacionados con el estrés oxidativo son las enzimas superóxido dismutasa (SDO2), catalasa y glutatión peroxidasa (GPX). En el trabajo realizado por Corrêa *et al.* (2008), encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de los transcritos del gen SDO2, en embriones cultivados *in vitro* en alta y baja tensión de oxígeno, siendo mayor en la primera. Los autores manifiestan que la expresión de este gen está asociada con una buena calidad embrionaria y a una reducción del número de células apoptóticas.

La expresión de los genes: interferon *tau* (If- τ), factor de crecimiento dependiente de la insulina 2 (IgF2), transporte de glucosa 1 (glut-1) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), están asociados a la presencia de FCS y BSA en la suplementación de los medios de cultivo (Lim *et al.*, 2007). Se sugiere que el origen proteico, utilizado en los medios, es determinante para el desarrollo embrionario, número de blastómeras, porcentaje de células apoptóticas y la expresión de otros genes, además de los ya mencionados, como proteína de estrés calórico (Hsp70), DNA metil-transferasa 3a (Dnmt3a), glicoproteína desmocolina III (DcIII) (Sagirkaya *et al.*, 2007).

En el trabajo de Dhali *et al.* (2009), muestran especial atención en la expresión de genes relacionados con la apoptosis. Estudios bioquímicos y morfológicos clásicos asocian la apoptosis con la fragmentación del ácido desoxirribonucleico (DNA), activación de caspasas, cambios en la función mitocondrial, condensación de la cromatina, fragmentación citoplasmática y bloqueo del desarrollo (Wang *et al.*, 2008).

Una familia de genes está caracterizada para la apoptosis, y son clasificadas Bcl-2, subdividida en pro-apoptóticos, en la que se encuentran: Bax, Bclxs, Bad, Bid, Bak, Bik entre otros y los genes anti-apoptóticos, destacan: Bcl-2, BclXI, Bcl-W y otros. Las proteínas de estos genes se encuentran en la membrana mitocondrial interna, manteniendo una relación muy estrecha con el funcionamiento del citocromo *b* (Meirelles *et al.*, 2004). La presencia de estos genes y transcritos han sido observados en ovocitos y embriones, pero los resultados obtenidos específicamente en embriones sobre la expresión de los genes Bax y Bcl-2 no son concluyentes (Meirelles *et al.*, 2004; Dhali *et al.*, 2009).

Durante el período preimplantacional, los embriones pueden mostrar una habilidad para adaptarse a las condiciones sub-óptimas de cultivo *in vitro*, pero no dejan de ser sensibles al ambiente en el que se desarrollan, lo que puede ocasionar alteraciones en estadios posteriores. De esta forma, en muchas ocasiones se combinan una reducción en la competencia para el desarrollo y condiciones subóptimas de cultivo para producir un retraso en los embriones, anomalías en el desarrollo y una reducción de la viabilidad (Lonergan *et al.*, 2006).

A pesar de que la suplementación del medio con suero permite la obtención de una alta tasa de desarrollo hasta el estadio de blastocisto, las variaciones de este compuesto podrían causar alteraciones en la ultraestructura del embrión, blastulación anormal, muerte fetal, síndrome del becerro gigante y aberración en el patrón de expresión de ácido ribonucleico mensajero (RNAm) (Sagirkaya *et al.*, 2007). Todas las características citadas hasta el momento tienen importantes repercusiones en la viabilidad de los EPIV. Las más importantes son la mayor sensibilidad a los efectos de las bajas temperaturas y menores índices de gestación tras la transferencia a receptoras. Ambos aspectos son de importancia

capital para rentabilizar el costo que supone la aplicación de estas tecnologías en las explotaciones pecuarias.

3. CRIOPRESERVACIÓN

El objetivo esencial de la criobiología es el mantenimiento a largo plazo de la viabilidad y funcionalidad celular, de forma que pueda ser recuperada después de un período de tiempo para continuar su desarrollo normal. La supervivencia celular a la congelación depende de numerosos factores físicos que interaccionan entre sí (Vila, 1984).

La criopreservación reduce los costos asociados a la aplicación de las biotecnologías reproductivas lo que evita la dependencia de la actividad reproductiva cíclica y el estado fisiológico del animal (por ejemplo, el mantenimiento de un rebaño de hembras receptoras). Permite también la conservación del patrimonio genético íntegro de los progenitores, a la vez que reduce las patologías asociadas con el mantenimiento de animales vivos o líneas celulares. Finalmente posibilita la conservación de animales en peligro de extinción y la creación de bancos de recursos genéticos.

3.1. Principios básicos de criobiología

Al conservar células a temperaturas extremadamente bajas (-196 °C) es posible detener por completo la actividad enzimática, la respiración celular, el metabolismo, el crecimiento, la multiplicación, sin afectar su viabilidad (Schneider y Mazur, 1984). No obstante, la mayoría de las células mamíferas mueren cuando se exponen a bajas temperaturas, a menos que previamente hayan sido expuestas a una solución que las proteja de rangos de enfriamiento y calentamiento específicos (Shaw *et al.*, 2000).

La criopreservación de material biológico tiene lugar en soluciones acuosas, con diferentes solutos presentes. Las propiedades fisicoquímicas que rigen los eventos a los cuales está sometida la solución durante la congelación deriva de la concentración de soluto disuelto en ella (Rall, 1992). Según Macferlane (1987), cuando los líquidos de una solución acuosa son

sometidos a la congelación, uno de sus componentes presenta la formación de una fase cristalina, mientras que el resto permanece en forma sólida con apariencia de vidrio, sin la formación de cristales de hielo.

La formación de este vidrio puede ser vista como una de las propiedades intrínsecas de todos los líquidos incluyendo el agua y las soluciones acuosas, que al ser sometidas a un alto grado de congelación, evitan fuertemente la formación de la fase cristalina. En soluciones acuosas de algunos líquidos moleculares, como el etilenglicol (EG), la formación de vidrio es usualmente observada a concentraciones superiores a 40% v/v. Esta composición corresponde a aquellos compuestos, en los cuales el punto de congelación de la solución ha sido lo suficientemente disminuida (Macferlane, 1987).

Cuando el EG alcanza una cierta concentración a bajas temperaturas, la viscosidad es suficientemente alta para impedir la cristalización (en función de la velocidad de enfriamiento; Rall, 1987). La formación de hielo aparece solamente cuando las concentraciones de los compuestos que conforman la solución son lo suficientemente bajas (Macfarlane, 1987) o cuando son sometidas a temperaturas de congelación que oscilan alrededor de -150°C como sucede con EG (Bronshteyn y Steponkus, 1995).

Las soluciones acuosas se mantienen en estado líquido mientras no se descienda de 0°C , temperatura de fusión del hielo. Este estado es constante hasta el momento en que aparece en el seno del líquido una reorganización molecular que va a provocar la solidificación de todo el sistema. Este cambio de estado (de líquido a sólido), permite al sistema de moléculas de agua alcanzar un nivel mínimo de energía, fenómeno que no se produce de forma instantánea y que depende de la velocidad de enfriamiento. Si la velocidad de enfriamiento no es muy elevada, la reorganización que aparece en un punto del sistema toma la forma de una red cristalina, en la que cada molécula de agua se dispone en el centro de un tetraedro cuyos vértices están ocupados por otras moléculas de agua (Fabbri *et al.*, 2000).

El agua líquida se transforma así en hielo cristalino formado por cristales hexagonales. Si, por el contrario, la velocidad de enfriamiento es muy alta las moléculas de agua se tornan inmóviles y permanecen fijadas sin organización aparente. Se produce entonces un fenómeno conocido como vitrificación, es decir, la formación de un estado sólido, amorfo, sin una red cristalina aparente. En este estado, la viscosidad del medio es tan elevada que las moléculas no pueden sino oscilar sobre sí mismas, sin producirse desplazamientos laterales (Yavin y Arav, 2007).

El daño en las células sometidas a temperaturas bajo cero es debido principalmente a dos factores físicoquímicos: la concentración de solutos que acompaña la formación del hielo (efecto osmótico) y la aparición de los cristales de hielo en el interior celular (cristalización intracelular). La incidencia de la lesión en estos casos depende de diversos parámetros, y especialmente de la permeabilidad de la membrana celular, que determina notablemente la probabilidad de nucleación intracelular, pero también de la relación superficie/volumen celular (Massip, 2003).

Después de varias experiencias preliminares dirigidas por Isachenko *et al.* (1998), concluyen que después de la congelación y posterior calentamiento los lípidos sufren una polimerización irreversible, sugiriendo que el proceso de congelación/calentamiento puede alterar las propiedades físicoquímicas de los lípidos intracelulares. La interacción entre las gotas lipídicas de las células y los elementos del citoesqueleto es compleja y el endurecimiento de estos lípidos puede ocasionar la deformación y destrucción del citoesqueleto.

3.2. Crioprotectores

Los agentes crioprotectores (CPA's) son esenciales para la criopreservación de casi todos los sistemas biológicos. Estos aditivos aunque no permiten 100% de supervivencia después de la congelación y descongelación, pueden prevenir algunos de los daños causados por la congelación (Fahy, 1986); alterando el comportamiento físico-químico de las soluciones acuosas en las cuales tiene lugar la criopreservación. Para los procedimientos de

criopreservación embrionaria, la concentración del CPA es muy importante y varía en función del sistema de criopreservación empleado, de las características de permeabilidad y composición de la membrana, el volumen de la célula, la temperatura y la diferencia de la presión osmótica entre los dos lados de la membrana (Agca, 2000). Los CPA's pueden clasificarse en dos grupos de acuerdo a la permeabilidad a través de la membrana celular: agentes penetrantes y no penetrantes.

3.2.1. Penetrantes

Los agentes penetrantes son sustancias de bajo peso molecular y por ello permeables a través de la membrana, que protegen a la célula de las lesiones producidas por la congelación a velocidad lenta. Ellos reducen el punto de congelación de la solución, previenen la exposición del ovocito a concentraciones altas de electrolitos extra e intracelulares debido a su sustitución parcial por el agua (Rall, 1992).

Los más utilizados en la congelación de embriones son: propilenglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), EG, glicerol entre otros. De todos, el EG es el crioprotector más ampliamente usado para la vitrificación de ovocitos y embriones debido a su baja toxicidad y su rápida capacidad de difusión a través de la membrana plasmática (Emiliani *et al.*, 2000)

3.2.2. No Penetrantes

Los CPA's no penetrantes son sustancias de alto peso molecular, que son efectivas cuando se utilizan velocidades altas de congelación. A pesar de que no penetran en la célula, ejercen su acción crioprotectora promoviendo una rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes; ellos incrementan la concentración de los solutos extracelulares generando un gradiente osmótico a través de la membrana celular, con la que atraen agua fuera de la célula deshidratándola. Los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa, polietilenglicol (PEG), Ficoll y lipoproteínas (Fabbri *et al.*, 2000).

En general, los crioprotectores son sustancias muy hidrosolubles que además de contribuir a la deshidratación celular por efectos osmóticos, actúan modificando el comportamiento

físico-químico de las soluciones acuosas. Modifican la estructura de las moléculas de agua, por una parte rompiendo uniones de hidrógeno y por otra, ligándose a ellas. Al actuar, en esta última característica, se impide la formación de hielo contribuyendo a favorecer la vitrificación, especialmente, a partir de ciertas temperaturas (Massip, 2003).

3.2.3. Mezclas de crioprotectores

La selección de los crioprotectores juega parte fundamental en el éxito de la criopreservación y al combinar varios agentes crioprotectores penetrantes y no penetrantes, se obtienen mejores resultados en lugar de emplear un solo agente en las soluciones de trabajo (Elnahas *et al.*, 2010). Los agentes crioprotectores son típicamente preparados en un medio buffer (TCM-199) entre pH 7,2 y 7,4 (Palasz y Mapletoft, 1996).

Diferentes estudios han demostrado que el EG junto con la glucosa, la fructosa, la trealosa o la lactosa son capaces de encapsular al ovocito o embrión previniendo la cristalización intracelular durante el calentamiento y actuando como tampón al reducir el choque osmótico que podría resultar de la dilución del crioprotector. También se ha observado que la adición de azúcares a los medios de criopreservación favorece la estabilidad de la membrana plasmática durante el proceso de vitrificación y calentamiento (Liebermann y Tucker, 2002). Otra de las estrategias para reducir la toxicidad de las soluciones crioprotectoras es el diseño de diferentes protocolos donde se combinan uno o varios crioprotectores que se suplementan con azúcares (Orief *et al.*, 2005) o macromoléculas (Checura y Seidel, 2007).

En la actualidad, es más frecuente el uso de soluciones de equilibrio (paso previo con la solución vitrificadora), que pueden estar compuestas por 7,5% de EG y 7,5% de DMSO en medio TCM-199 suplementado con 20% de suero fetal bovino (Arav *et al.*, 2002; Trígal *et al.*, 2011; Gutnisky *et al.*, 2013; Ha *et al.*, 2014), mientras que la solución vitrificadora contiene un 15% de EG, 15% de DMSO, sacarosa a 0,5M y suplementada con 20% de suero fetal bovino en TCM-199 (Trígal *et al.*, 2011; Asgari *et al.*, 2012).

Todo parece indicar que el éxito de la selección de uno o varios crioprotectores para la congelación de embriones permanecerá sujeta a dos criterios fundamentales: la concentración y tiempo de exposición, sin dejar de tener en cuenta, el tipo de protocolo de criopreservación puesto en práctica para cada especie.

3.3. Técnicas

El primer protocolo efectivo para la criopreservación de células de mamíferos fue establecido hace 60 años y desde entonces se han hecho progresos considerables (Shaw *et al.*, 2000). Se han realizado varios estudios comparando diversos métodos de criopreservación, los cuales se han clasificado de acuerdo a la velocidad de enfriamiento y calentamiento, entre estos tenemos: congelación lenta convencional (Rall, 1992), congelación lenta-descongelación rápida, congelación ultrarrápida y la vitrificación, la cual fue propuesta por Luyet en 1937 y aplicado en la actualidad exitosamente (Al-Hasani *et al.*, 1987).

3.3.1. Congelación

Los protocolos de congelación clásica (congelación lenta) tienen la ventaja de utilizar bajas concentraciones de CPA's, lo que reduce la toxicidad química y el shock osmótico. Estos protocolos, llamados también "métodos de equilibrio" conducen a que, en una primera fase, el agua salga de la célula al encontrarse inmersa en un medio extracelular en el que hay mayor concentración de solutos. Esta salida de agua que se produce como respuesta a una diferencia de presiones osmóticas en los dos medios, conduce a la penetración del crioprotector en el interior de la célula.

En una segunda fase, y con el fin de que se igualen las presiones osmóticas del medio intra y extracelular, el agua vuelve a penetrar en la célula para alcanzar la llamada "fase de equilibrio", que depende del tipo de célula, el estadio de desarrollo, el radio superficie/volumen, el crioprotector utilizado y la temperatura a la que tiene lugar el tratamiento.

Las fases del proceso de congelación son: a) adición del agente crioprotector, b) enfriamiento del embrión, inducción de la formación de hielo (*seeding*), congelación y almacenamiento en nitrógeno líquido (N₂L), c) calentamiento, y d) retirada del crioprotector. Los procesos de congelación clásica, conocidos por su utilidad en el caso de los EPIV, inducen importantes cambios celulares tanto en el caso de estos embriones, como en el de los ovocitos, comprometiendo su desarrollo posterior (Massip, 2003).

La primera referencia de la congelación de embriones data de 1972, cuando Whittingham *et al.*, anunciaron el nacimiento de una camada de ratones a partir de embriones congelados. En el ganado vacuno, el primer ternero nacido tras la transferencia de embriones congelados/calentados fue anunciado en 1973 (Wilmot y Rowson, 1973); mientras que en 1974 y 1976 se obtuvieron crías en ovejas (WillaDEen *et al.*, 1974) y cabras (Bilton y Moore, 1976), respectivamente. Más tarde, en 1989, Hayashi *et al.*, anunciaron el primer nacimiento de un lechón empleando la misma técnica.

3.3.2. Vitrificación

La vitrificación reduce los daños producidos por el frío utilizando altas concentraciones de CPA's y elevadas velocidades de enfriamiento y calentamiento, evitando la formación de cristales de hielo (Rall y Fahy 1985; Vajta *et al.*, 1998, Dinnyés *et al.*, 2000, Vieira *et al.*, 2002). Durante la vitrificación, y tras un enfriamiento ultrarrápido, aumenta la viscosidad del medio que contiene al embrión/ovocito, alcanzándose un estado sólido sin cristalización (estado vítreo). En estas soluciones muy concentradas de crioprotectores (>6M), las células sufren una deshidratación osmótica previa al enfriamiento (Yavin y Arav, 2007).

La deshidratación determina cambios en el volumen osmótico de los embriones durante el proceso de crioconservación, sin que se formen cristales de hielo durante el enfriamiento, almacenamiento o calentamiento. La mayor velocidad de los cambios de temperatura ofrece dos ventajas: permite reducir el tiempo de contacto entre el embrión y los CPA's, disminuyendo así los efectos tóxicos y osmóticos, y limitando el riesgo de lesiones por la exposición a bajas temperaturas debido a la rápida transición por la zona de "temperatura

crítica” (Yavín y Arav, 2007), frente a la que los embriones presentan una elevada fragilidad.

Hasta ahora, la criobiología ha sido desarrollada, permitiendo el nacimiento de cientos de “crías” de distintas especies, incluyendo la humana. Hoy en día, la criobiología puede ser considerada como una ciencia que progresa de forma paralela al avance de la biología de la reproducción y a las técnicas de reproducción asistida.

3.3.3. Vitrificación ultrarrápida

Varias estrategias se han propuesto para minimizar el daño ocasionado por la vitrificación como la reducción tanto del volumen de crioprotector como del tamaño del contenedor y la suplementación con macromoléculas como la albúmina (Seidel, 2006; Horvath y Seidel, 2006) o polímeros sintéticos como ficoll (Hou *et al.*, 2005), PVA (Asada *et al.*, 2002), PVP, PEG y dextrano (Orief *et al.*, 2005).

Los protocolos clásicos de vitrificación en pajueta, han sido sustituidos por los recientemente desarrollados métodos de vitrificación ultrarrápida, en los que se ha reducido el radio superficie/volumen de la solución de CPA's, con el consiguiente incremento de las velocidades de enfriamiento y calentamiento, al favorecerse el intercambio de temperaturas entre la muestra y la fuente de temperatura (frío/calor). Para que la vitrificación sea eficaz, se precisa una exposición de mínima duración a la solución crioprotectora (Gardner *et al.*, 2007) y la disposición del embrión en volúmenes muy reducidos de medio (0,5 μ L de medio).

Todas estas aproximaciones se basan en que los embriones van a experimentar el proceso de enfriamiento en menos de 5 min, lo que contrasta con los métodos clásicos de congelación, cuyos tiempos de equilibración oscilan en torno a los 10-20 min. Así, técnicas como OPS (Vajta *et al.*, 1998), vitrificación sobre superficie sólida (SSV; Dinnyés *et al.*, 2000), cryotips (Conaghan y Fischer, 2010), dispositivo de vitrificación por microfiltración de membrana (MFMV, Matsunari *et al.*, 2010), cryotops (Kuwayama *et al.*, 2005), tamaño

mínimo de la gota (MDE, Arav *et al.*, 1996) y *fibreplug* (Wang *et al.*, 2009) se usan de forma rutinaria en muchos laboratorios de fecundación *in vitro*, con mejores resultados que los obtenidos tras la vitrificación clásica en pajuelas.

Sin embargo, la técnica de vitrificación presenta dos limitaciones importantes:

1. el calentamiento requiere dilución y retirada del crioprotector previo a la transferencia embrionaria. Las condiciones de manipulación (temperatura ambiental 39°C), temperatura de las soluciones de calentamiento 41°C, dilución en soluciones con concentraciones decrecientes de sacarosa) son difíciles de establecer en las fincas, muy importante en el caso del ganado vacuno.
2. la técnica no es sanitariamente segura. Sólo la utilización de N₂L filtrado, y el almacenamiento de los embriones/ovocitos en recipientes cerrados puede asegurar la esterilidad de la técnica. Debe tenerse en cuenta el potencial riesgo de contaminaciones cruzadas, especialmente si se almacenan de forma conjunta embriones y gametos de diferentes especies (Wrathall *et al.*, 2006). Este aspecto cobra especial importancia también, en el caso de los Bancos de Recursos Zoogenéticos. Sin embargo, en la actualidad se han modificado algunos de los protocolos, utilizando N₂L estéril, o recipientes capaces de albergar y aislar perfectamente al embrión/ovocito.

3.4. Alteraciones causadas por la criopreservación

Durante el proceso de congelación, las células embrionarias experimentan modificaciones en su volumen, debido a las diferentes presiones osmóticas existentes entre las soluciones intracelulares y extracelulares. El procedimiento de criopreservación comprende una exposición inicial del embrión a los agentes crioprotectores, congelación, almacenamiento, calentamiento, y finalmente la dilución y retirada de los agentes crioprotectores, volviendo a un ambiente fisiológico que le permita continuar su desarrollo.

Estos cambios afectan varios parámetros de importancia para la supervivencia del embrión, incluyendo la integridad de la membrana plasmática (Arav *et al.*, 1996; Horvath y Seidel, 2006; Elnahas *et al.*, 2010) y la de sus organelos celulares (Agca, 2000) o alteraciones físicas en la ZP, que muestra señales claras del daño ocasionado por las técnicas de criopreservación (Da Silva y Metelo, 2005).

La supervivencia del embrión bovino a los protocolos de criopreservación depende de varios factores como son la técnica empleada, la duración de exposición del crioprotector y su concentración, así como la forma de eliminarlo tras el calentamiento (Fabbri *et al.*, 2000; Shirazi *et al.*, 2009). Otros factores relacionados son las condiciones de cultivo (Saragusty y Arav, 2011), la calidad, el estadio y edad del embrión (Abdalla *et al.*, 2010), además de la composición y estructura celulares (Saragusty y Arav, 2011).

La exposición de la membrana plasmática a las bajas temperaturas durante la congelación determina una alteración de la fase de transición, de forma que su estructura y función se ven alteradas (Zeron *et al.*, 2002; Hou *et al.*, 2005; Gardner *et al.*, 2007). La primera consecuencia negativa para la membrana es una modificación en su permeabilidad, lo que determina cambios en el flujo del agua y de los crioprotectores a través de la misma (Shaw *et al.*, 2000). Los resultados de supervivencia *in vitro* de los EPIV tras la vitrificación/calentamiento presentan una elevada heterogeneidad. Aunque varios autores presentan datos que oscilan entre el 70% y el 80% (Gómez *et al.*, 2008; Shirazi *et al.*, 2009; Siqueira *et al.*, 2011), otros grupos citan resultados menos optimistas, al reportar un 35% de supervivencia valorada a las 72 h después del calentamiento (Yu *et al.*, 2010).

Entre los daños ocasionados por la criopreservación está la reducción de la habilidad de los blastocistos vitrificados/calentados de continuar la división mitótica (Kaidi *et al.*, 1999) o inducir la necrosis o apoptosis en las células embrionarias. El número de blastómeras mostró un descenso en ambos grupos de blastocistos vitrificados/calentados, probablemente, debido a la alta sensibilidad de la MCI a la degeneración celular durante los procesos de criopreservación. En el estudio realizado por Shirazi *et al.* (2009), también se muestra una disminución en el número de blastómeras, la cual fue más marcada en los

blastocistos expandidos que en los blastocistos de otros estadios. Los resultados referidos a porcentajes de gestación tras la transferencia de estos embriones criopreservados a hembras receptoras son igualmente dispares, y frecuentemente realizados sobre un número de receptoras relativamente bajo (Tabla 1).

Así, los índices de gestación oscilan entre el 6,5% obtenido por Al-Katanani *et al.* (2002) hasta el 63% de Agca *et al.* (1998), en cualquier caso, resultados inferiores a los obtenidos tras la transferencia de EPIV frescos. Coincidiendo con estos resultados, datos recientemente publicados, presentan índices de gestación del 44% tras la transferencia de embriones vitrificados (en soportes *fibreplug*) a hembras receptoras, frente a un 60% de gestaciones observadas tras la transferencia de embriones frescos que actuaron como controles (Trigal *et al.*, 2011).

Tabla 1. Índices de gestación y nacimientos, tras la transferencia de embriones bovinos producidos *in vitro* y criopreservados.

Método de Criopreservación	Soporte/crioprotectores	Embriones transferidos	Gestación	Nacidos (%)	Referencia
Congelación lenta	Pajuelas 250 µL/Glicerol	10	42%	NI	Hasler <i>et al.</i> (1995)
	Pajuelas 250 µL/1,4 M Glicerol	17	41%	7 (77)	Agca <i>et al.</i> (1998)
	Pajuelas 250 µL	418	44,7%	NI	Dochi <i>et al.</i> (1998)
	Pajuelas 250 µL/Glicerol	22	4,8%	NI	Ambrose <i>et al.</i> (1999)
	Pajuelas 250 µL/10% Glicerol	213	44%	NI	Merton <i>et al.</i> , (2013)
Vitrificación	Pajuelas 250µL (25% EG +25%DMSO)	20	35%	6 (30)	Vajta <i>et al.</i> (1997)
	Pajuelas 250 µL (20% Glicerol + "0% EG)	16	63%	8 (67)	Agca <i>et al.</i> (1998)
	OPS	20	6,5%	NI	Al-Katanani <i>et al.</i> (2002)
	OPS (16,5% EG + 16,5% DMSO)	7	27,7%	NI	Block <i>et al.</i> (2010)
	Cryotop (EG + DMSO)	96	46,8%	34,3%	Gutnisky <i>et al.</i> (2013)

NI: No indican.

3.5. Estrategias para la criopreservación de embriones bovinos PIV

A pesar del progreso significativo experimentado durante los últimos años en la criopreservación de embriones de mamífero, muchos de los eventos moleculares y bioquímicos en los que se basan estas tecnologías no están del todo aclarados. Hoy la vitrificación parece sustituir a los antiguos protocolos de congelación lenta, al mostrar alentadores porcentajes de supervivencia. La vitrificación debe ser aceptada como una alternativa real, viable, segura y eficiente para el abordaje de la criopreservación de EPIV.

No obstante, no debemos dejar de lado recientes revisiones del problema que abordan nuevos protocolos de congelación lenta en bovinos (Yu *et al.*, 2010; Akiyama *et al.*, 2010; Pryor *et al.*, 2011). Las estrategias actuales se orientan a: primero, lograr la optimización de los protocolos de vitrificación mediante el diseño de nuevos soportes que permitan la modificación de la relación superficie de la célula/volumen de la solución de vitrificación, y con el fin de lograr un incremento de las velocidades de enfriamiento y calentamiento (gradiente térmico); segundo, la mejora de la calidad embrionaria mediante la utilización de aditivos durante el cultivo de los embriones, o en las soluciones de vitrificación.

La mejora de la calidad de los embriones a criopreservar pasa por el establecimiento de condiciones de cultivo que den lugar a embriones con características lo más similares posibles a las de sus homólogos obtenidos *in vivo*. Por ejemplo, la eliminación del FCS y su sustitución por BSA incrementa la supervivencia embrionaria a la vitrificación (Gómez *et al.*, 2008). Otros procedimientos, como la retirada de los lípidos citoplasmáticos (Diez *et al.*, 2001), el uso de citocalasina B (CB) (Dobrinsky *et al.*, 2000), y más recientemente la aplicación del método de eclosión asistida por laser (laser assisted hatching, LAH) en combinación con la CB y delipidación (Pryor *et al.*, 2011), han demostrado mejorar la supervivencia de los EPIV a la criopreservación.

Últimamente, se ha propuesto el empleo de IGF-I ó EGF, en el período de cultivo posterior al calentamiento (Makarevich *et al.*, 2011). El EGF es un polipéptido con una potente actividad mitogénica en embriones bovinos PIV (Sirisathien *et al.*, 2003a). Actúa sobre el

embrión vía paracrina, ya que es únicamente sintetizado por la madre. Estudios realizados en el bovino, han demostrado que no existe transcripción del gene que codifica el EGF en los embriones preimplantacionales, pero sí se detectan copias del receptor del EGF, los cuales se encuentran en el TE y actúan activando el intercambio iónico Na^+/H^+ que producen aumento en la entrada de agua al BC y, por tanto, promueven la expansión del blastocisto (revisado por Izquierdo, 1996).

Contrariamente el IGF-I, es un polipéptido de una sola cadena con una estructura homóloga a la proinsulina y regula la proliferación, diferenciación y actividad anti-apoptótica en embriones preimplantacionales (Makarevich y Markkula, 2002). Según, Makarevich *et al.* (2011), el uso de IGF-I mejora la supervivencia y calidad de los embriones congelados/calentados, mediante la inhibición de la apoptosis. Esta característica ya ha sido reportada por otros autores (Byrne *et al.*, 1999, 2002; Makarevich y Markkula, 2002; Sirisathien y Brackett, 2003). Se cree que el aporte del EGF, al mejoramiento de la calidad embrionaria está asociado a la alta expresión del gen IGF2 y muy baja expresión del gen Bax (un gen pro-apoptótico; Uhm *et al.*, 2010).

Con el avance de la biotecnología, se desarrollan nuevos métodos para el estudio y entendimiento de los problemas derivados de la criopreservación. El desarrollo de estrategias para reducir el estrés asociado con la criopreservación es fundamental para comprender mejor, las causas de bajos índices de supervivencia tras el calentamiento de los embriones. La aplicación de una presión hidrostática subletal (*High Hydrostatic Pressure*; HHP) ha surgido durante los últimos cinco años como una alternativa para intentar disminuir la sensibilidad de ovocitos, espermatozoides y embriones a la criopreservación (Pribenszky *et al.* 2010).

El efecto de la exposición de la célula a la presión le generaría un estrés responsable de una serie de cambios que inducirían a la adaptación e incremento de la supervivencia a la criopreservación (Pribenszky *et al.* 2010). Este mecanismo adaptativo podría ser debido a la producción de proteínas chaperonas de la familia de las proteínas de choque térmico (Pribenszky *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2008). El nivel de presión aplicada y su duración

dependen de la especie y del tipo de gameto, o del estadio de desarrollo del embrión. Por ejemplo, los ovocitos porcinos MIV pueden soportar la presión de sólo 20 MPa, mientras que los blastocistos de ratón pueden sobrevivir a una presión de hasta 90 MPa durante 30 min (Pribenszky *et al.*, 2005, Du *et al.*, 2008). Los índices de supervivencia post-criopreservación mejoraron en ovocitos porcinos y bovinos (Du *et al.*, 2008, Pribenszky *et al.*, 2008), en blastocistos de ratón y espermatozoides de cerdo tras el tratamiento de presión (Pribenszky *et al.*, 2005).

El tratamiento de embriones bovinos producidos *in vitro* a 80 MPa durante 45 min, mejoró su supervivencia tras congelación/calentamiento (Pribenszky *et al.*, 2005). Resultados similares fueron obtenidos en embriones bovinos tras vitrificación, y tras un tratamiento de 60 MPa durante 1 h. El tratamiento de presión también incrementó la calidad de embriones ovinos, al disminuir el número de núcleos picnóticos en los embriones vitrificados (Bogliolo *et al.*, 2007). El empleo con HHP puede inducir cambios en la transcripción de genes de varias familias en diversas especies. Existen datos que indican que determinados genes relacionados con rutas y eventos metabólicos particulares como el estrés oxidativo (superóxido dismutasa, SOD y catalasa-glutation peroxidasa, GPX4), el estrés calórico (HSPA1A) o el metabolismo de lípidos (SC4MOL) son inducibles por la elevada presión hidrostática y también pueden promover protección al embrión frente a la criopreservación (Kuzmany *et al.*, 2011; Siqueira *et al.*, 2011).

Estos autores detectaron un incremento significativo ($P < 0,05$) de la tasa de re-expansión y eclosión post-calentamiento en EPIV sometidos a un tratamiento HHP (60MPa, 1h), con 1 ó 2 h de equilibrio antes de la vitrificación. El período de equilibrio tras el tratamiento es crucial y parece beneficiar al embrión tras el tratamiento con HHP, al incrementar su tolerancia a nuevos episodios estresantes, como los relacionados con la congelación/calentamiento (Siqueira *et al.*, 2011). Así, la expresión de los genes analizados mostró una tendencia general a incrementarse después de 1 h del período de equilibrio previa a la vitrificación. La HHP es entonces, una técnica que promete seguir proporcionando datos interesantes sobre el comportamiento de gametos y embriones ante

las bajas temperaturas, aunque todavía es necesario profundizar en cuáles pueden ser sus mecanismos de actuación.

La decisión sobre cuál es el método de elección para una muestra concreta (un embrión bovino PIV en nuestro caso) deberá descansar sobre los índices de desarrollo *in vitro*, pero sobre todo *in vivo*, obtenidos en la fase de experimentación, así como en la posibilidad de aplicar la técnica en condiciones de “campo”.

3.6. Valoración del desarrollo y cambios ultraestructurales de los embriones PIV frescos y vitrificados

La literatura concerniente a la calidad de los embriones bovinos cada vez es más abundante. Generalmente se suele utilizar una combinación de valoraciones indirectas de la viabilidad embrionaria. Las principales valoraciones son morfológicas, pruebas metabólicas, análisis de expresión genética, tinciones nucleares específicas y ultraestructurales (Sirard *et al.*, 2006). Muy frecuentemente, el éxito del sistema de cultivo suele ser medido en función de la tasa de división (Shoukir *et al.*, 1997; Sakkas *et al.*, 1998), del número de embriones que alcanzan el estadio de blastocistos (Mucci *et al.*, 2006), ya que esta fase representa el primer indicador visible de la divergencia en el desarrollo de dos líneas celulares distintas, el TE y la MCI (Cesari *et al.*, 2006).

Técnicamente, la evaluación morfológica de los blastocistos mediante un microscopio estereoscópico, es un criterio utilizado para valorar el desarrollo de los embriones de cultivo. Las características observadas son diversas: el color/oscuridad del embrión, la homogeneidad del tamaño de las blastómeras, la granulación citoplasmática y la fragmentación de las células (Lonergan *et al.*, 2006).

Otro indicador no invasivo utilizado para la valoración del potencial de desarrollo de los embriones es la cinética de desarrollo, ya que los embriones que se desarrollan más rápidamente tienen más posibilidad de llegar al estadio de blastocisto y escapar de la ZP, también llamada tasa de eclosión, que los que evolucionan más lentamente (Duque *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2007; Trigal *et al.*, 2011a). Específicamente, en los embriones

vitrificados/calentados, la tasa de supervivencia es determinada al evaluar la proporción de blastocistos que muestran re-expansión y eclosión. Para los blastocistos, las tasas de re-expansión *in vitro* se establecen entre las 2 y 48 h de cultivo después del calentamiento. La viabilidad después del calentamiento de los blastocistos se establece de acuerdo al protocolo utilizado durante el proceso de PIV, ya que puede variar, según la incidencia de los factores a lo largo del proceso de criopreservación (Yu *et al.*, 2010).

Al finalizar la fase de re-expansión, se producen contracciones periódicas en el blastocisto, la ZP muy debilitada, se fisura y permite en ese momento la salida del embrión (Pereira y Marques, 2008). En esta etapa se puede observar la salida del embrión por la ruptura de la ZP, la alta calidad del embrión para sobrevivir y eclosionar por lo que sería indicador de que su criopreservación ha sido satisfactoria (Elnahas *et al.*, 2010).

La habilidad de los EPIV para sobrevivir a los procesos de criopreservación es un indicador de la calidad embrionaria (Lonergan *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2005). Abdalla *et al.* (2010), afirman que las mayores tasas de eclosión y supervivencia se observaron en los blastocistos expandidos. La diferencia morfológica entre los blastocistos y blastocistos expandidos, que se hace evidente, es el tamaño del BC (Vanderzwalmen *et al.*, 2002). La relación entre el tamaño del blastocisto y su criotolerancia han sido tema de investigación; mientras el blastocisto aumenta en tamaño mejora su respuesta a la criopreservación, al compararlo con blastocistos de menor tamaño (Keskinetepe y Brackett, 2000; George *et al.*, 2008).

Saha *et al.* (1996), afirman que la edad de los embriones puede influir sobre sus características criobiológicas. Los blastocistos bovinos derivados de la FIV más jóvenes o de siete d de cultivo, se consideran más viables y capaces de sobrevivir a la criopreservación que los que alcanzan este estadio a los ocho o nueve d de cultivo (Mahmoudzadeh *et al.*, 1995), considerando a estos últimos blastocistos retrasados o bien, poco viables (Dinnyés *et al.*, 1999).

Es posible que la alta tasa de supervivencia de los blastocistos y blastocistos expandidos de 7 d, sea porque son embriones más vigorosos y probablemente sobrevivan mejor a la

criopreservación (Han *et al.*, 1994). Asimismo, entre los blastocistos que se desarrollan el mismo día, los embriones que llegan a expandirse o alcanzar un mayor diámetro son más criotolerantes (Mucci *et al.*, 2006).

La apoptosis, otro indicador de la calidad embrionaria, que puede ser detectado durante el período preimplantacional (Vandaele *et al.*, 2006) con especial atención a los EPIV (Warzych *et al.*, 2007). Este evento hace referencia a una forma de muerte celular y que está regulada genéticamente, con un papel importante en el desarrollo y homeostasis del embrión; actuando eficazmente como un mecanismo de control celular mediante la eliminación de células dañadas, alteradas, no funcionales e incluso aquellas que muestran un número excesivo (Jacobson *et al.*, 1997).

El estudio e identificación de células apoptóticas se ha logrado realizar con el empleo de tinciones específicas como la *Terminal deoxynucleotidil transferase dUTP Nick end labeling* (TUNEL), que detecta la incorporación de desoxiuridina trifosfato (16-dUTP) teñida con biotina o biotinilada, en una reacción catalizada por la enzima transferasa desoxinucleotidil terminal (TdT), la cual añade bases a los extremos 3'-OH del DNA en una secuencia y cantidad no específica, creando una señal que aumenta en función de la proporción de rupturas de DNA. Esta técnica fue inicialmente desarrollada para células somáticas y posteriormente modificada para su aplicación en ovocitos, espermatozoides y embriones. La observación se realiza en un microscopio de fluorescencia (Evenson y Wixon, 2006).

Existen otras técnicas muy poderosas, como la microscopía electrónica, que evidencian los cambios ultraestructurales que manifiesta el embrión preimplantacional durante las diferentes etapas de desarrollo o procesos de criopreservación. En mamíferos, cuando la ZP es evaluada empleando la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) se puede observar que esta estructura está compuesta por una malla dispersa por numerosos poros y con una morfología superficial interna y externa diferente. La morfología externa muestra una superficie a manera de enrejado (malla) y la interna una apariencia áspera (Keefe *et al.*, 1997).

Los reportes referidos a la apariencia de la ZP en embriones bovinos PIV es limitada. Los cigotos muestran una superficie compacta y lisa. Tres días después de la FIV, sólo dos patrones principales de apariencia son hallados en la ZP de embriones bovinos de 8 células. La primera señal son los depósitos granulares en la superficie de la ZP y la segunda, la aparición de capas estratificadas. A los seis días post-inseminación, la superficie rugosa es determinante en la ZP de las mórulas valoradas (Verini *et al.*, 1996).

Vanroose *et al.* (2000), afirman que el aspecto rugoso de embriones bovinos de 8 células y mórulas, podrían ser el resultado del depósito del material biológico secretado por las células del oviducto empleadas en sus sistemas de cultivo. Para los embriones de 7 días de cultivo, la forma de los poros es en general circular o elíptica y están arbitrariamente distribuidos (Da Silva y Metelo, 2005). Estas observaciones claramente demuestran que la ZP es una estructura dinámica que puede cambiar constantemente e incluso capaz de reparar daños (Vanroose *et al.*, 2000).

La ZP que rodea al embrión también puede actuar como una barrera natural durante los procedimientos de criopreservación, impidiendo el libre movimiento de agua y crioprotectores entre los compartimientos intra y extracelulares (Saragusty y Arav, 2011). Los blastocistos bovinos PIV y criopreservados sufren alteraciones en la ZP y pérdida en la capacidad de desarrollo luego del calentamiento. Aparentemente, la ZP en estos blastocistos muestra un menor número de poros y más pequeños comparados con el grupo de blastocistos frescos. Los resultados de este estudio demuestran que los pasos involucrados en la criopreservación lenta o vitrificación, causan alteraciones en la ZP, con daños irreversibles sobre el desarrollo de la competencia embrionaria (Da Silva y Metelo, 2005).

Al emplear la Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) se fortalece el diagnóstico correspondiente a la distribución y aparición de organelos e inclusiones citoplasmáticas (Crosier *et al.*, 2000). Abe *et al.* (2002), empleando la TEM, reveló que la distribución y número de gotas lipídicas citoplasmáticas y mitocondrias en los embriones bovinos PIV cambia durante el período de desarrollo. En embriones de 8 células, pequeñas gotas

lipídicas y mitocondrias inmaduras estaban distribuidas al azar en el citoplasma de las blastómeras. Gran número de gotas lipídicas y mitocondrias elongadas fueron observadas en el citoplasma de TE y MCI. Por su parte, Crosier *et al.* (2001), reporta que los blastocistos bovinos cultivados en presencia de suero, poseen gran número de vesículas citoplasmáticas, gotas lipídicas, cuerpos apoptóticos, figuras mitóticas, material degenerado y mitocondrias inmaduras, maduras y vacuoladas.

En cuanto a los blastocistos criopreservados, Cocero *et al.* (2002), observaron diferencias en el grado de integridad incluso entre blastómeras de un mismo embrión después del calentamiento. Algunos de ellos presentan citoplasmas con numerosas mitocondrias, ribosomas, vesículas, microfilamentos y microtúbulos, mientras que otras mostraron claras señales de alteración (bajo número de mitocondrias, abundantes vesículas con varios tipos de contenidos y áreas vacías). En algunas células, fueron evidentes algunos síntomas de lisis en los diferentes componentes celulares, tales como, interrupciones en la envoltura nuclear, cavidades nucleares y mitocondrias rotas.

En bovinos, Mohr y Trouson (1981), concluyeron que la regiones de unión entre blastómeras resultaron ser muy resistentes a las lesiones provocadas por la congelación; y más aún, una gran proporción de componentes celulares como el retículo endoplasmático rugoso, microfilamentos y las membranas mitocondriales y nucleares eran estructuralmente inalteradas por la congelación/descongelación. Vajta *et al.* (1997), afirman que los blastocistos bovinos sometidos a vitrificación y posterior calentamiento, sufren un grado de regeneración celular que es observado entre las primeras h de re-expansión, y que la morfología embrionaria es normalizada a las 24 de iniciado el calentamiento, concluyendo que la vitrificación de embriones bovinos PIV, está caracterizado por un marcado daño celular que progresivamente puede ser regenerado.

La criopreservación mediante la técnica de vitrificación permite mejorar la supervivencia embrionaria una vez ocurrido el calentamiento (Vajta *et al.*, 1999); además de producir menos estrés metabólico en los embriones, da lugar a mejores tasas de desarrollo y a mayores porcentajes de gestación tras su transferencia en hembras receptoras (Vieira *et al.*,

2002). Sin embargo el grado de daño producido por la criopreservación depende de factores como el tamaño y la forma de las células, la permeabilidad de las membranas así como de la calidad y sensibilidad específica de las blastómeras (Vajta y Kuwayama, 2006).

En resumen, se tiene que la manipulación de los sistemas de cultivo, mediante la suplementación de los medios o el empleo de sustitutos de las fuentes proteicas convencionales, pueden mejorar la calidad de los embriones, y con ella, la supervivencia *in vitro* después de la vitrificación, contribuyendo a una mejora notable en los resultados de TE, mediante el empleo de blastocistos vitrificados/calentados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención y maduración *in vitro* de ovocitos bovinos

Los ovarios fueron obtenidos después del sacrificio de hembras bovinas mestizas en un matadero comercial y transportados al laboratorio en un tiempo inferior a 90 min a ~35 °C en solución de NaCl al 0,9% suplementada con 1000 UI/mL penicilina G (G1397, Sigma) y 50 mg/mL de sulfato de estreptomicina (S9137, Sigma) en recipientes isotérmicos.

Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron lavados tres veces con la misma solución y a la misma temperatura anteriormente descrita. Los COC's, se recuperaron mediante la aspiración de los folículos, con ayuda de una jeringa de 10 mL y una aguja de 18G, y fueron depositados en un tubo cónico de 50 mL (Axigen®, California, EUA) con medio de lavado TCM-199 Hepes (11150-030, Gibco) y suplementado con 22 mg/L de piruvato sódico (P4562, Sigma), 50 mg/L de gentamicina (G1397, Sigma), 0,4 g/L de BSA (A6003, Sigma) y 10% de FCS (F4135, Sigma).

Transcurridos 5 min para permitir la sedimentación del contenido, se descartó el sobrenadante y el pellet se depositó en una placa de Petri de 100 x 15 mm (Falcon®, Franklin Lakes, EUA), para proceder a la búsqueda de los COC's. Fueron seleccionados bajo un microscopio estereoscópico (SZX12, Olympus, Japón), aquellos que mostraron mayor tamaño, al menos tres capas completas de células del *cumulus* compacto, citoplasma homogéneo y sin signos de picnosis.

El medio de maduración empleado fue el TCM-199 (11150-059, Gibco), suplementado con 22 mg/L de piruvato sódico (P4562, Sigma), 50 mg/L de gentamicina (G1397, Sigma), 10 µg/mL de la FSH (Folltropin-V®, Bioniche), 2 µg/mL de 17-β-estradiol (E-2758, Sigma) y 10% de FCS (F4135, Sigma). Los COC's fueron cultivados en grupos de 20 en microgotas de 100 µL y cubiertas con aceite mineral (M3516, Sigma) en placas de Petri de 35 x 10 mm (Falcon®, Franklin Lakes, EUA) e incubadas durante 24 h a 38,5 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ y aire saturado de humedad.

2. Fecundación *in vitro*

Los espermatozoides fueron recuperados mediante la técnica de *swim-up* (Parrish *et al.*, 1986). Una vez descongeladas las pajuelas (a 37°C x 30 seg), fueron depositadas en tubos cónicos (Axigen®, California, EUA) con 5 mL de medio TL-Semen y centrifugado (Thermo Scientific IEC CL10, EUA) a 1000 xg durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y al pellet de 200 µL fue depositado en el fondo de un tubo eppendorf con 1 mL de medio de capacitación (Tabla 2) incubándose durante 1 h.

Se recuperaron 800 µL del sobrenadante y se lavaron con 5 mL del medio TL-FIV, suplementado con 30 µg/mL de heparina (H3149, Sigma), 20 µM de penicilamina (P4875, Sigma), 10 µM de hipotaurina (H1384, Sima) y 2 µM/mL de epinefrina (E4250, Sigma). Los tubos fueron centrifugados a 1000 xg durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y al pellet de 100 µL aproximadamente se determinará la concentración espermática mediante una cámara de Neubauer o hemocitómetro. Los COC's madurados fueron lavados dos veces en el medio TL- Semen (Tabla 3) y dos veces en medio TL-FIV (Tabla 4), para luego ser trasladados a placas de Petri de 35 x 10mm (Falcon®, Franklin Lakes, EUA), en grupos de 20 en gotas de 100 µL de medio TL-FIV y fecundados con una concentración final de 1×10^6 esperm/mL. Los gametos fueron cultivados durante 17 h, a 38,5°C en una atmósfera con 5% de CO₂ en aire saturado de humedad.

Tabla 2. Composición del Medio de Capacitación Espermática

Componente	Producto, Compañía	Concentración
NaCl	S 5886, Sigma	100,0 mM
KCl	P 5405, Sigma	3,0 mM
NaH ₂ PO ₄	S 5011, Sigma	0,3 mM
NaHCO ₃	S 5761, Sigma	25,0 mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	C 7902, Sigma	2,00 mM
MgCl ₂	M 8266, Sigma	3,08 mM
Acido láctico (60%)	L 4263, Sigma	26,0 mM
Hepes	H 6147, Sigma	10,0 mM
Rojo fenol	P 0290, Sigma	10 µM
Piruvato sódico	P 4562, Sigma	1,05 mM
Gentamicina	G 1397, Sigma	50,0 µg/mL
BSA - FAF	A 6003, Sigma	6,34 mg/mL
Agua	W1503, Sigma	

Tabla 3. Composición del Medio TL-Semen

Componente	Producto, Compañía	Concentración
NaCl	S 5886, Sigma	100,0 mM
KCl	P 5405, Sigma	3,0 mM
MgCl ₂ 6H ₂ O	M 2393, Sigma	0,4 mM
NaH ₂ PO ₄	S 5011, Sigma	0,3 mM
NaHCO ₃	S 5761, Sigma	25,0 mM
CaCl ₂ H ₂ O	C 7902, Sigma	2,0 mM
Acido láctico (60%)	L 4263, Sigma	26,0 mM
Rojo fenol	P 0290, Sigma	30 µM
Hepes	H 6147, Sigma	10,0 mM
Piruvato sódico	P 4562, Sigma	2,0 mM
Gentamicina	G 1397, Sigma	50,0 µg/mL
Agua	W1503, Sigma	

Tabla 4. Composición del Medio TL-FIV

Componente	Producto, Compañía	Concentración
NaCl	S 5886, Sigma	114,0 mM
KCl	P 5405, Sigma	3,0 mM
MgCl ₂ 6H ₂ O	M 2393, Sigma	0,5 mM
NaH ₂ PO ₄	S 5011, Sigma	0,3 mM
NaHCO ₃	S 5761, Sigma	25,0 mM
CaCl ₂ H ₂ O	C 7902, Sigma	2,0 mM
Acido láctico (60%)	L 4263, Sigma	12,0 mM
Rojo fenol	P 0290, Sigma	30 µM
Piruvato sódico	P 4562, Sigma	0,2 mM
Gentamicina	G 1397, Sigma	50,0 µg/mL
BSA - FAF	A 6003, Sigma	6,0 mg/mL
Agua	W1503, Sigma	

3. Cultivo *in vitro* de embriones

La separación de las células del *cumulus* y los espermatozoides adheridos a la superficie de los presuntos cigotos se realizó mediante agitación mecánica en medio TCM-199 Hepes (11150-030, Gibco), empleado para la recuperación de los COC's aspirados. Los presuntos cigotos fueron lavados dos veces en el mismo medio y depositados, en grupo de 25-30, en microgotas de 50 µL de medio mSOFaaci, suplementado con aminoácidos (BME 50x, MEM 100X, Sigma), citrato (106448, Merck), myo-inositol (I7508, Sigma) descrito por Holm *et al.* (1999; Tabla 5). Las microgotas fueron cubiertas con aceite mineral (M3516, Sigma) e incubadas a 38,5 °C en una atmósfera con 5% de CO₂, 5% de O₂ y aire saturado

de humedad durante 8 d. El medio de cultivo se recambió los d 3 y 6 pos-FIV, empleando para ello placas nuevas con 50 µL de medio mSOFaaci recién suplementado.

Tabla 5. Composición del Medio mSOFaaci

Componente	Producto, Compañía	Concentración
NaCl	S 5886, Sigma	110,0 mM
KCl	P 5405, Sigma	7,16 mM
KH ₂ PO ₄	P5655, Sigma	1.2 mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	M 1880, Sigma	0,72 mM
Acido Láctico (60%)	L 4263, Sigma	5,0 mM
NaHCO ₃	S 5761, Sigma	25,0 mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	C 7902, Sigma	1,78 mM
L-Glutamina	G 8540, Sigma	0,2 mM
BME Aminoácidos	B 6766, Sigma	10,0 µL/mL
MEM Aminoácidos	M 7145; Sigma	10,0 µL/mL
Myo-inositol	I 7508, Sigma	2,77 mM
Tri-Sodio citrato dihidratado	S 4641, Sigma	0,34 mM
Piruvato sódico	P 4562, Sigma	0,727 mM
Gentamicina	G 1397, Sigma	50,0 µg/mL
Rojo fenol	P 0290, Sigma	30 µM
Agua	W1503, Sigma	

4. Vitrificación de blastocistos en *fibreplug*

Los blastocistos y blastocistos expandidos de día 7 y 8 de cultivo fueron vitrificados por el método reportado por Vajta *et al.* (1998) con ligeras modificaciones. Rápidamente los embriones fueron transferidos a un medio de mantenimiento (MM), que consiste en TCM 199-Hepes + 20% de FCS. Todos los procedimientos se realizaron a una temperatura ambiente de 30°C y en una superficie caliente de 41°C. Grupos de 3 a 4 blastocistos fueron expuestos al MM con 7,5% de etilenglicol (EG; 24204, Riedel-de Haën) + 7,5% DMSO (D2438, Sigma; solución de vitrificación 1, VS1) durante 3 min y luego se pasaron a una solución que contiene MM con un 16,5% EG + 16,5% DMSO + 0,5 M de sacarosa (601, HiMedia) (solución vitrificadora 2; VS2) durante 30 seg.

Los blastocistos se cargaron en los contenedores *fibreplug*, a los que, rápidamente, se pusieron en contacto por varios seg en una superficie de aluminio previamente enfriada, antes de sumergirlos en N₂L. El calentamiento se realizó, sumergiendo directamente el *fibreplug* en un MM con 0,5 M de sacarosa durante 5 min. Posteriormente fueron pasados a

una solución menos concentrada de sacarosa 0,25M durante 5 min. Por último, fueron lavados dos veces en MM por 5 min cada uno y transferidos a las gotas 50 µL de mSOFaaci recién suplementado (BSA, 6 mg/mL+ 10% de FCS).

5. Valoración de los Resultados

5.1. Progresión meiótica de los ovocitos

Para evaluar la progresión meiótica, los ovocitos fueron desnudados de sus células del *cumulus* mediante agitación mecánica y fijados en una mezcla de metanol (32213, Riedel-de Haën)-ácido acético (9507-03, Baker Analyzed) en proporción 3:1 durante al menos 48 h a 4°C. Luego se procedió a teñirlos con aceto-orceína (OR00200025, Scharlau) al 1,1%, evaluando la maduración nuclear bajo un microscopio de contraste de fases (400X, Olympus CX31, Japón), clasificándolos según el estadio meiótico alcanzado en: maduros (Metafase II + corpúsculo polar) o inmaduros (anafase I, metafase I, condensación cromosómica y VG). Aquellos ovocitos que no pudieron ser incluidos en ninguno de los grupos anteriormente nombrados fueron clasificados como degenerados.

5.2. Evaluación de la fecundación *in vitro*:

La penetración de los ovocitos, tras 17 h de cultivo con los espermatozoides, fue valorada mediante la toma de una muestra de ovocitos de las placas de fecundación, fijándose del mismo modo que la muestra correspondiente a la maduración. Los ovocitos tras ser teñidos con aceto-orceína, fueron considerados penetrados cuando al menos se observó una cola de espermatozoide en su citoplasma, y fueron clasificados como:

a.- **Normalmente Fecundados** (2PN+C): cuando en el citoplasma de los cigotos se observen 2 pronúcleos, uno femenino y otro masculino, y una cola de espermatozoide, o bien, una cabeza de espermatozoide descondensándose acompañada de su cola y de un pronúcleo femenino.

b.- **Asincrónicos**: en este grupo, los ovocitos son penetrados solamente por un espermatozoide, pero se observa alguna alteración o retraso marcado en la formación de los pronúcleos, como cabeza del espermatozoide no descondensada o una telofase II.

c.- **Poliespérmicos** (>2PN): cigotos en los que se observen más de 2 pronúcleos en su citoplasma. Dentro de este grupo se consideraron: cuando en su citoplasma se observaron más de dos pronúcleos y los dos corpúsculos polares, más de dos cabezas de espermatozoides descondensándose o más de dos colas.

5.3. Evaluación de la división y desarrollo embrionario

Todos los embriones fueron observados bajo microscopio estereoscópico (Olympus, SZX12, Japón). La tasa de división embrionaria se evaluó el día 3 (48 h después de iniciado el cultivo), tomándose en cuenta para ello el total de embriones de 2 o más células obtenidos en relación al total de ovocitos puestos a fecundar. Tras 7 y 8 d de cultivo, los blastocistos se separaron del resto de los embriones, para evitar confusión durante el proceso de vitrificación.

5.4. Supervivencia embrionaria post-calentamiento

Después de la descongelación, los embriones fueron lavados dos veces en medio mSOF (6 mg/mL) y cultivados en microgotas de 50 μ L de medio mSOFaa (BSA, 6 mg/mL) suplementado con 10% de FCS, cubiertas con aceite mineral (M3516, Sigma). La supervivencia embrionaria fue valorada por la re-expansión a las 2, 24 y 48 h.

5.5. Contenido lipídico

Los embriones fueron fijados en 10% de formaldehído en PBS, pH 7,4, durante 2 h a temperatura ambiente. Después de la fijación, se lavaron en agua destilada con 0,05% de PVA (P8136, Sigma) y luego transferidos a gotas de etanol (32221, Sigma) al 50% en agua destilada. Después de 2 min, los embriones fueron teñidos en gotas de 1% de Sudan Black B (S-668, Fisher) (m/v) en etanol (32221, Sigma) al 70% por 1-2 min. Posteriormente, fueron lavados tres veces en etanol (32221, Sigma) al 50% durante 5 min en cada lavado, seguido por un lavado de 5 min en 0,05% de PVA en agua destilada. Los embriones teñidos fueron colocados en 10 μ L de glicerol (G 9012, Sigma) sobre portaobjetos y se observaron bajo el microscopio óptico (CX31, Olympus) a 600X y fotografiadas (C-5060, Olympus) con un aumento de 400X.

Para estimar el número de gotas lipídicas en el citoplasma de cada embrión, se emplearon dos metodologías: cuantificación de gotas lipídicas y el análisis semicuantitativo de lípidos (propuestos por Abe *et al.*, 2002 y Sudano *et al.*, 2012, respectivamente), con ligeras modificaciones. En la primera se empleó una rejilla con cinco cuadros de $1,600 \mu\text{m}^2$ (40 x 40), diseñado en el software Image J 1.41 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Cada cuadro fue subdividido por líneas punteadas continuas para alcanzar una medida de $10 \mu\text{m}$. Las gotas de lípidos fueron clasificadas como pequeñas, medianas y grandes ($< 2 \mu\text{m}$, $2-6 \mu\text{m}$ y $>6 \mu\text{m}$, respectivamente). El número de gotas fueron contadas en los cinco cuadros y clasificadas en cada embrión. Los datos relativos a la acumulación de lípidos se expresaron como número de gotas por $1,000 \mu\text{m}^2$.

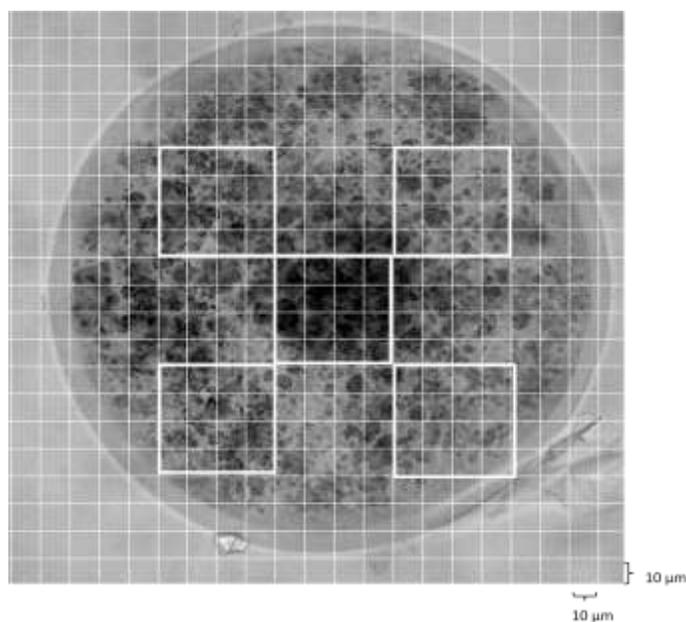


Figura 3. Rejilla para la cuantificación de gotas lipídicas en embriones teñidos con Sudan Black B.

Para estimar la abundancia relativa de lípidos, bajo el análisis semicuantitativo, las imágenes fotografiadas fueron procesadas con el software Adobe Photoshop Actendex. Las fotografías a color de cada blastocisto, fueron convertidas en imágenes en escala de grises a las que se le ajustó el brillo y contraste, mostrando una primera medida, en pixels, del área total; además se seleccionó el área de interés, también medida en pixels, arrojando un valor denominado índice de positividad (índice +), determinado por el área de interés/área total.

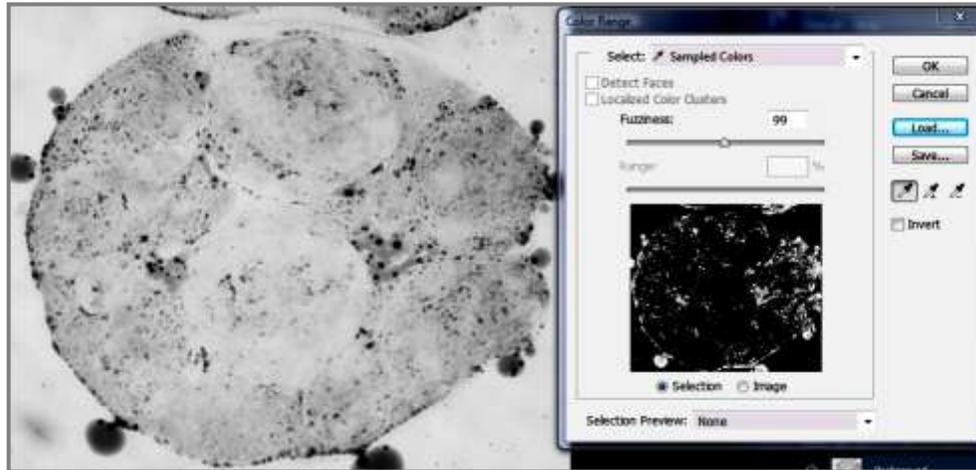


Figura 4. Conversión semicuantitativa del contenido de lípidos bajo el software Adobe Photo Shop Actendex (400X).

5.6. Tinción de apoptosis

Blastocistos frescos y vitrificados/calentados fueron fijados y teñidos para determinar apoptosis mediante TUNEL, según lo reportado originalmente por Gavrieli *et al.* (1992), usando el Kit de detección de muerte celular *in situ* (DeadEndTM Fluorometric TUNEL System, G3250, Promega). Los blastocistos fueron lavados tres veces en gotas de 50 μ L de PBS con PVA a 0,1mg/mL durante dos min en cada paso. Posteriormente, fueron fijados en paraformaldehído (K31076805, Merk) al 4% en PBS a pH 7,4 durante 1 h a temperatura ambiente. Después fueron lavados tres veces en PBS-PVA. Luego de la fijación, los blastocistos fueron permeabilizados con triton X-100 (H5142, Promega) al 0,5% en PBS durante 40 min, manteniéndose por 2 ó 3 semanas en placas *nunc* a 4 °C en PBS-BSA (10mg/mL) o usados directamente para la tinción.

Para el procedimiento de TUNEL, los blastocistos fueron lavados en PBS-PVA e incubados en gotas de 25 μ L de la mezcla de reacción de TUNEL, que contiene 12- desoxiuridina trifosfato (dUTP) unido a fluoresceína y la enzima transferasa desoxinucleotidil terminal (TdT) por 1 h a 37 °C en oscuridad. Las muestras fueron lavadas tres veces en PBS-PVA. Blastómeras intactas fueron teñidas con 4',6 diamino-2-fenilindol dihidroclorido (DAPI,

D9542, Sigma) (1 µg/mL) en gotas de 25 µL por 10 min en oscuridad. Después fueron lavados en gotas de PBS-PVA entre 2 y 3 veces.

Después de la incubación con H₂O₂ (H0904, Sigma) a 100 µM en gotas de 25 µL por 2 h, el control positivo fue teñido con el kit de TUNEL, mientras que el control negativo fue incubado en la solución de tinción en ausencia de la enzima transferasa desoxinucleotidil terminal (TdT). La evaluación de TUNEL-positivas y el total de células se realizó mediante la evaluación de cada uno de los blastocistos a través de un microscopio de fluorescencia (BX40, Olympus) equipado con un filtro de 450-490 nm de excitación, una barrera de 520 nm de emisión, usando un objetivo de 40X. La apoptosis con fragmentación de los núcleos se observaron de color verde o rojas usando un filtro de 520 ± 20 nm, mientras que los núcleos normales aparecen como un color azul a 460nm. El índice de apoptosis fue calculado como la relación entre el número de núcleos TUNEL-positivas/ el número total de núcleos contados.

5.7. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Los blastocistos se fijaron en una mezcla de glutaraldehído (16220, EMS) al 2,5% y ácido tánico (S25600, Fisher Science Education) al 2% en 0,1 M buffer cacodilato (11652, EMS), pH 7,4 a 4 °C, durante 1 h. Posteriormente fueron lavados en buffer cacodilato por 10 min y se fijaron en tetróxido de osmio al 1% (19100, EMS) durante 2 h. Los embriones fueron deshidratados en concentraciones crecientes de etanol (50, 70, 80, 90 y 100%) durante 5 min y 15 min en dos cambios sucesivos de etanol al 100%. Posteriormente, fueron inmersos en óxido de propileno-Araldite 506 (A3183, Sigma) (3:1; 1:1 y 1:3) durante 2 h cada uno e incrustados en resina Araldite 506 pura durante 72 h en una estufa a 60 °C para su polimerización.

Para delimitar el área de estudio se realizaron secciones semifinas de 700 nm de espesor de las muestras con un ultramicrotomo (Leica UM-UC6) con cuchilla de diamante. Las secciones semifinas se tiñeron con azul de toluidina al 1% y fueron observadas en el microscopía de luz (Zeiss Axioskop FL-40, Germany), con cámara digital incorporada y software analizador de imágenes (AxioVision LE Cannon Modul, Carl Zeiss, Germany). Las

micrografías fueron tomadas con objetivo de 100X. Las secciones ultrafinas de 80 nm, se colocaron en rejillas y fueron teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo durante 10 min, se dejaron secar a temperatura ambiente. Por último, las secciones ultrafinas se analizaron a través del microscopio electrónico de transmisión JEOL 1010 (Akishima, Japón).

6. Diseño Experimental:

Experimento 1: *Producción in vitro de embriones bovinos en diferentes sistemas de cultivo.* Los COC's fueron madurados, fecundados como se ha descrito previamente y se cultivaron en los siguientes grupos:

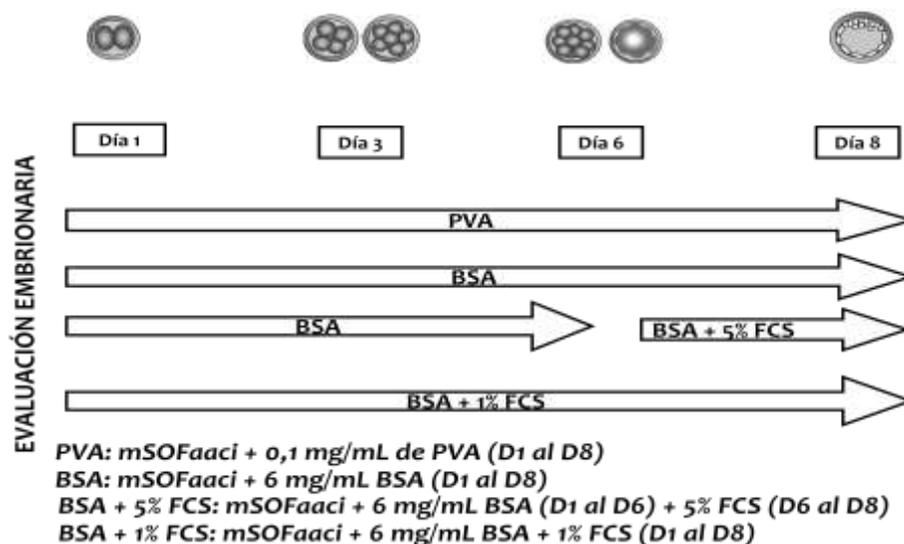
PVA: Fluido oviductal sintético suplementado con aa esenciales, no esenciales, mio-inositol y citrato + 0,1mg/L de PVA (polivinil-alcohol, P8136, Sigma) (mSOFaaci), desde el D1 al D8 de cultivo.

BSA: mSOFaaci + 6 mg/L de BSA, desde el D1 al D8.

BSA + 5% FCS: mSOFaaci + 6 mg/L de BSA (D1 al D6) + 5% de FCS, desde el D6 al D8.

BSA + 1% FCS: mSOFaaci + 6 mg/L de BSA + 1% de FCS, desde el D1 al D8.

El número y la morfología de los embriones fueron evaluados a los 3, 6, 7 y 8 d de cultivo. El día 8 se analizó el contenido lipídico, apoptosis (TUNEL), y el análisis ultraestructural embrionario.



Experimento 2: *Tasa de supervivencia y calidad embrionaria de blastocistos bovinos vitrificados en fibreplug.* Para este experimento y el siguiente, fue empleado el sistema de cultivo que obtuvo la mayor proporción de blastocistos, menor contenido lipídico y menor número de células apoptóticas. Los blastocistos y blastocistos expandidos de 7 y 8 d de cultivos fueron vitrificados en contenedores *fibreplug* por al menos una semana en N₂L.

Después del calentamiento los embriones fueron cultivados en medio mSOFaaci + 6 mg/mL BSA y 10% de FCS y fue valorada la re-expansión a las 2, 24 y 48 h. Este experimento también fue diseñado para evaluar el efecto de la edad del embrión y su criotolerancia mediante el conteo de células apoptóticas y análisis ultraestructural mediante MET, 2 h después del calentamiento.

Experimento 3: *Efecto del EGF sobre la supervivencia y calidad post-vitrificación de blastocistos bovinos PIV.* Blastocistos y blastocistos expandidos de 7 y 8 d de cultivos fueron vitrificados en contenedores *fibreplug* por al menos una semana en N₂L. Después del calentamiento, un grupo de blastocistos fue cultivado en medio SOFaa + 6 mg/mL de BSA y 10% de FCS + 50 ng/mL de EGF y otro grupo en medio mSOFaa + 6 mg/mL de BSA y 10% de FCS sin EGF durante 24 h. Se valoró la re-expansión a las 2, 12 y 24 h, mientras que la calidad embrionaria a las 24 h.

7. Análisis Estadístico:

El contenido lipídico, número de núcleos apoptóticos de blastómeras de embriones fueron expresados en media \pm desviación estandar (DE) y analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) usando el modelo lineal general (GLM) del paquete estadístico SAS[®]. Las medias fueron comparadas usando el test de Tukey. Las fuentes de variación en el modelo incluyen las concentraciones de PVA, BSA y FCS e interacciones de primer orden; todos los factores se consideraron efectos fijos. Los resultados obtenidos en la tasa de división embrionaria, porcentaje de blastocistos, al igual que la tasa de re-expansión en los embriones vitrificados/calentados, fueron expresados como frecuencias y analizados mediante el test de χ^2 . Las diferencias entre las frecuencias se consideraron significativas para valores de *P* menores a 0,05.

RESULTADOS

Experimento 1: *Producción in vitro de embriones bovinos en diferentes sistemas de cultivo.*

Un total de 1.033 ovarios fueron procesados en este trabajo, de los cuales se obtuvieron 4.505 COC's seleccionados como aptos para la maduración *in vitro*, resultando un valor de 4,36 COC's por ovario.

Maduración ovocitaria *in vitro*.

Para la valoración de la tasa de progresión meiótica, 382 ovocitos fueron fijados y teñidos (Figura 5), tras 23 h de cultivo, alcanzando una tasa de maduración *in vitro* de 68,06% (260/382; Tabla 6).

Tabla 6. Progresión meiótica de ovocitos bovinos madurados *in vitro*

Nº Ovocitos Maduros				Nº Ovocitos Inmaduros			Nº	
MII + CP (%)	Telo I (%)	Ovoc. mad. (%)	AnaI (%)	MI (%)	CCII (%)	VG (%)	Ovoc. inmd. (%)	Ovoc. Deg. (%)
212 (55,49)	48 (12,56)	260 (68,06)	9 (2,35)	91 (23,82)	2 (0,52)	3 (0,78)	105 (27,48)	17 (4,45)

MII+CP: metafase II + corpúsculo polar, TeloI: telofase I, Ovoc. mad.: total de ovocitos maduros, AnaI: anafase I, MI: metaphase I, CCII: condensación cromosómica II, VG: vesícula germinal, Ovoc. inm.: total de ovocitos inmaduros, Ovoc. Deg.: total de ovocitos degenerados.

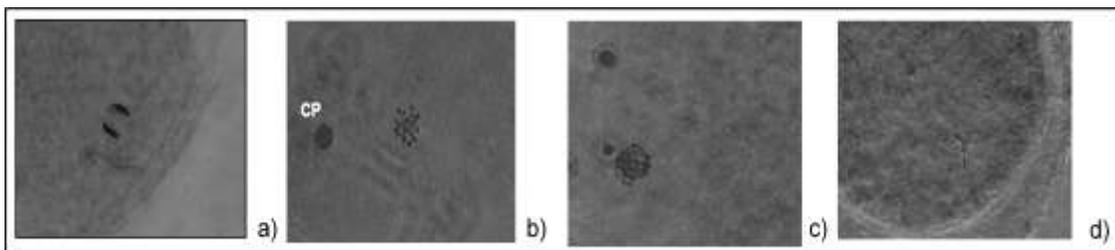


Figura 5. Progresión meiótica de ovocitos bovinos madurados *in vitro* (400X): (a) TeloI, (b) MII+CP. Ovocitos bovinos degenerados: (c) MI, d) Material nuclear degenerado.

Fecundación *in vitro*.

Cuatrocientos cinco ovocitos fueron seleccionados para el análisis de la tasa de penetración a las 17 h post-inseminación (hpi), siendo analizables 391 (Figura 6). Los resultados de la FIV se muestran en la Tabla 7. La proporción de ovocitos normalmente fecundados (2PN+C) fue de 41,43% (162/391).

Tabla 7. Tasa de fecundación *in vitro* de ovocitos bovinos

Ovocitos Penetrados					Ovocitos No Penetrados (%)	Ovocitos degenerados (%)
2PN+C (%)	>2PN (%)	AS (%)	Telo II (%)	Total Ovoc. P. (%)		
162 (41,43)	1 (0,25)	50 (12,78)	42 (10,74)	255 (65,21)	103 (26,34)	33 (8,43)

2PN+C: 2 pronúcleos más cola, >2PN: más de 2 pronúcleos, AS: asincrónicos, TeloII: telofase II, Total Ovoc. P.: Total de ovocitos penetrados.

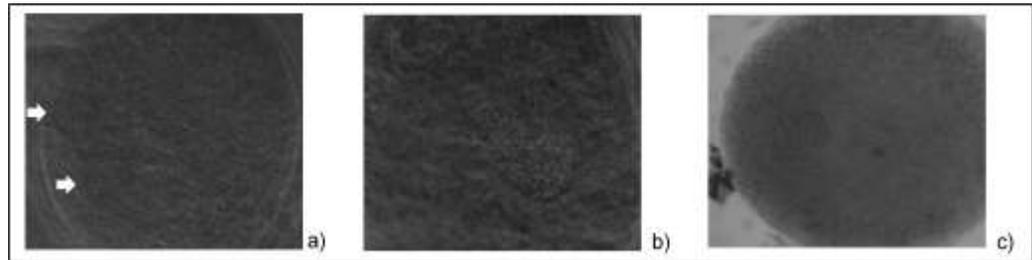


Figura 6. Valoración de la fecundación *in vitro* (400X): ovocitos penetrados: (a) 2PN (flechas blancas), (b) 3PN, (c) 1 PN.

Tasa de división y desarrollo embrionario:

Tras la toma de la muestra a las 17 hpi, los presuntos cigotos fueron puestos en CIV y distribuidos al azar en los tres grupos experimentales. El análisis estadístico indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de embriones con >4 células de los tres grupos experimentales evaluados. La mayor tasa de embriones, de 2 o más células, lo mostraron el grupo de PVA (69,0%) y BSA (64,8%), mostrando diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) con el grupo de BSA+1%FCS (53,8%).

Tabla 8. Efecto del suplemento en el medio de cultivo mSOFaaci sobre la tasa de división embrionaria

mSOFaaci	N	D3	
		> 4células (%)	Total divididos (%)
PVA	632	224 (35,4)	436 (69,0) ^a
BSA	823	264 (32,0)	534 (64,8) ^a
BSA+1%FCS	507	183 (36,1)	273 (53,8) ^b

N: presuntos cigotos puestos en cultivo. (^{a,b}) Valores en la misma columna muestran diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).

A los 6 d de cultivo, fue valorado el porcentaje de mórulas, en el que se observaron diferencias significativas (P<0,05) entre los grupos de cultivo evaluados: PVA (54,1%), BSA (37,8%) y BSA+1%FCS (29,0%) (Tabla 9). Una vez realizado el conteo de mórulas, en cada una de las experimentales, alrededor del 50% del total de embriones provenientes del grupo de BSA fueron transferidos al azar a medio nuevo suplementado con 5% de FCS (BSA+5%FCS) hasta el D8.

En el día 7 (D7) de cultivo, el menor porcentaje blastocistos y blastocistos expandidos lo mostró el grupo de BSA+ 1% FCS (Figura 7). Los porcentajes más altos de blastocistos de día 8 (D8), fueron para el grupo de BSA y PVA, aunque sólo mostraron diferencias estadísticamente significativas con el grupo de BSA+ 1% FCS. En cuanto al número de blastocistos expandidos del mismo día, sólo se mostraron diferencias entre el tratamiento suplementado con BSA más suero al 1% y 5%.

Tabla 9. Efecto del suplemento en el medio de cultivo mSOFaaci sobre el desarrollo de embriones bovinos PIV

mSOFaaci	Mórula Día 6 (%)	Embriones D7		Embriones D8	
		Blastocistos (%)	Expandidos (%)	Blastocistos (%)	Expandidos (%)
PVA	342 (54,1) ^a	108 (17,1) ^a	16 (2,5) ^a	104 (16,5) ^a	22 (3,5) ^{a,b}
BSA	311 (37,8) ^b	82 (19,3) ^a	15 (3,5) ^a	81 (19,0) ^a	19 (4,4) ^{a,b}
BSA+5% FCS	-	71 (17,8) ^a	10 (2,5) ^a	62 (15,6) ^{a,b}	20 (5,0) ^a
BSA+1% FCS	147 (29,0) ^c	60 (11,8) ^b	4 (0,8) ^b	59 (11,63) ^b	12 (2,3) ^b

(^{a,b,c}) Valores en la misma columna muestran diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).

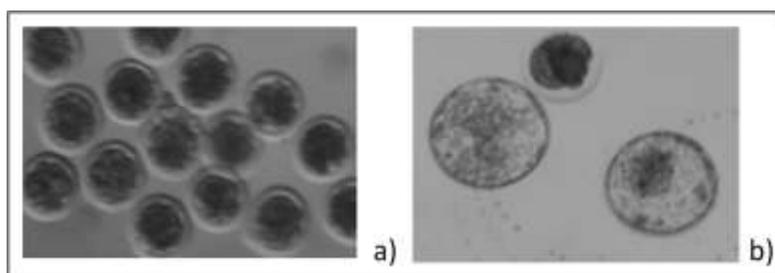


Figura 7. División y desarrollo embrionario: (a) Embriones bovinos de varios estadios de > 4 células (D3) (20X), (b) Blastocistos bovinos expandidos (D8) (50X).

Contenido lipídico

Setenta y seis blastocistos fueron asignados para el análisis de contenido lipídico, siendo analizables 44 (11 blastocistos para cada tratamiento, Figura 8). En la evaluación del tamaño de las gotas lipídicas se obtuvieron diferencias significativas (P<0,05) para el número de gotas pequeñas entre los grupos de BSA + 1% FCS y el resto de los tratamientos. Para el grupo de gotas medianas el menor número lo presentó el sistema de cultivo con PVA (0,1 mg/mL) y BSA + 1% FCS. El tratamiento con BSA + 5% FCS,

mostró el mayor número de gotas grandes ($>6 \mu\text{m}$) ($P<0,05$), seguido de los embriones cultivados en presencia de BSA. Los resultados se muestran en la Figura 9.

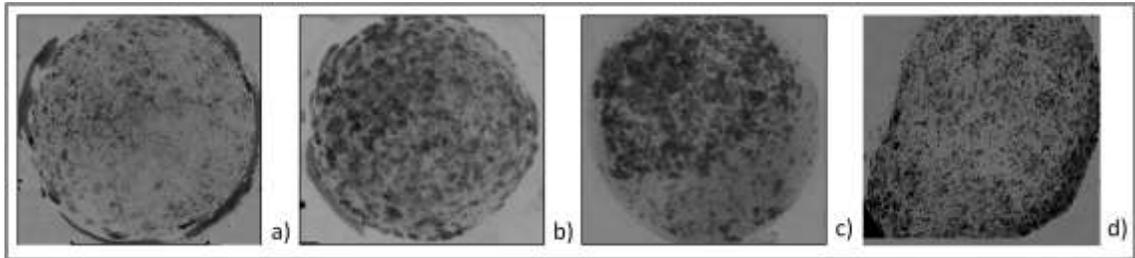


Figura 8. Blastocistos de D8 de cultivo teñidos con Sudan Black B (600X): (a) Tratamiento con medio mSOFaaci: PVA, (b) BSA y (c) BSA+5%FCS y (d) BSA+1%FCS.

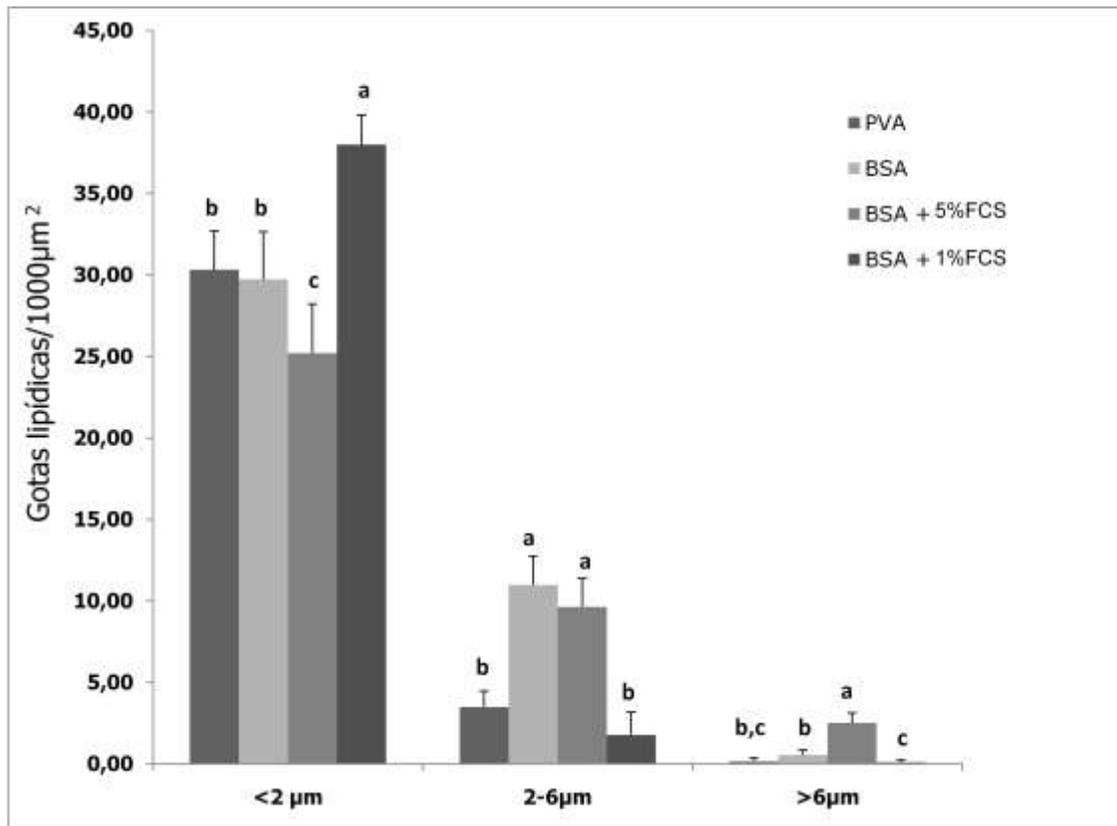


Figura 9. Efecto de diferentes sistemas de cultivo sobre el número de gotas lipídicas pequeñas (<2 μm), medianas (2-6 μm) y grandes (>6 μm) en blastocistos bovinos PIV. El número de gotas es expresado en media \pm DE. (a,b,c) Diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$) entre grupos de la categoría gotas pequeñas, medianas y grandes.

En cuanto al método de medida semicuantitativa, el mayor número de gotas citoplasmáticas se encuentran en los blastocistos desarrollados en el medio de cultivo suplementado con BSA +5%FCS ($P<0,05$), seguido del grupo BSA, BSA + 1% FCS y el tratamiento con PVA, con en el menor contenido de gotas lipídicas. Estos resultados son muy similares a lo reportado con el primer método, demostrando que el aporte de suero fetal está directamente relacionado con la aparición en número y tamaño de gotas lipídicas.

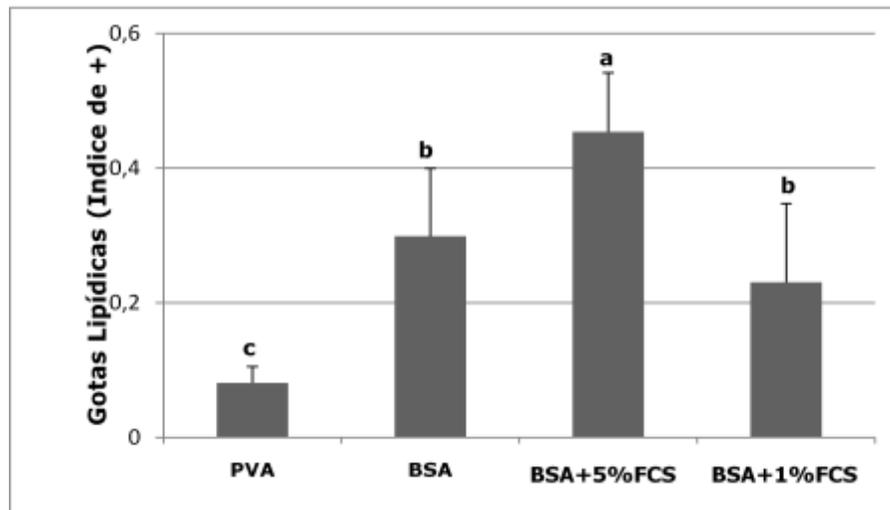


Figura 10. Análisis de imagen (medida semicuantitativa) de gotas lipídicas de blastocistos bovinos producidos *in vitro* cultivados en diferentes sistemas de cultivo.

Las medidas arbitrarias están expresadas en media \pm DE. (^{a,b}) Diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$) entre los tratamientos.

Apoptosis

El número de núcleos totales, apoptóticos e índice de apoptosis fueron detectados en un total de 43 blastocistos y blastocistos expandidos de D8 y PIV. El número medio de núcleos apoptóticos de los blastocistos procedentes de los medios suplementados con PVA resultaron muy similares a los de BSA. El mayor número de núcleos totales y apoptóticos aumenta con la presencia de suero suplementado en los medios de cultivo. El mismo efecto aparece con el índice de apoptosis ($P<0,05$). Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Detección de apoptosis mediante TUNEL en blastocistos bovinos producidos *in vitro* en diferentes sistemas de cultivo

mSOFaaci	Blastocistos, n	Núcleos apoptóticos, media ± DE	Núcleos totales, media ± DE	Índice de apoptosis, % ± DE
PVA	11	7,2 ± 1,0 ^b	83,4 ± 7,6 ^c	8,0 ± 1,9 ^b
BSA	12	7,5 ± 1,3 ^b	99,5 ± 4,5 ^b	7,5 ± 1,2 ^b
BSA+5%FCS	11	11,0 ± 3,5 ^a	112,7 ± 10,1 ^a	9,2 ± 2,4 ^{a,b}
BSA+1%FCS	9	13,0 ± 7,5 ^a	116 ± 19,6 ^a	10,4 ± 2,9 ^a

(a,b,c): Valores en la misma columna con diferentes superíndices difieren significativamente (P<0,05).

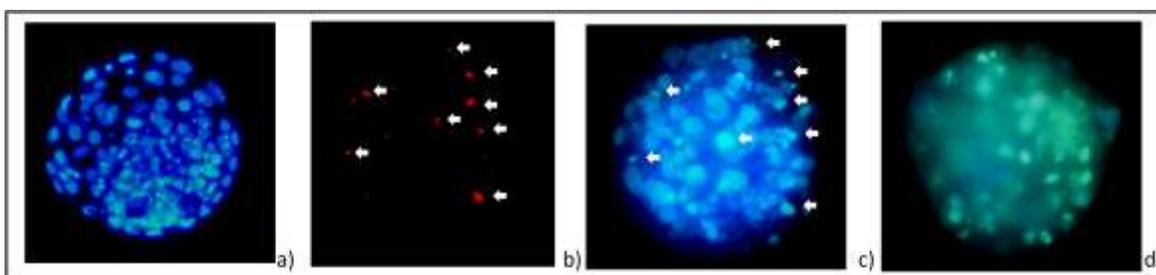


Figura 11. Blastocistos bovinos teñidos con TUNEL (400X): (a) blastocisto del control negativo, (b) blastocisto con células apoptóticas en rojo (flechas blancas, 520 nm), (c) blastocisto con células normales azules y células apoptóticas en verde (flechas blancas, 460 nm), (d) blastocisto del control positivo.

Ultraestructura de blastocistos bovinos frescos

Veintiséis blastocistos frescos fueron seleccionados y procesados para el análisis ultraestructural y distribuidos de la siguiente manera: un número de 12 blastocistos para el grupo de PVA y BSA, 14 para BSA+ 5% FCS y BSA+ 1% FCS. De los 26 blastocistos, sólo 20 fueron analizables, 4 se perdieron durante el proceso de fijación y 2 no pudieron ser tallados por el ultramicrotomo. En la Figura 12, se muestran los cortes de las secciones semifinas (700 nm) de los blastocistos en los distintos sistemas de cultivo *in vitro*. Los blastocistos se caracterizaron por mostrar formas esféricas (Figuras 12 A y D, se muestran dobladas producto del tratamiento de fijación/deshidratación), en las que son fácilmente detectados la ZP y BC. No se mostraron evidencias de cambios degenerativos ni diferencias

morfológicas aparentes entre los cuatro grupos experimentales. La MCI, sobresale notablemente en el BC, y puede ser diferenciada de las células aplanadas del TE, que se encuentran apiladas debajo de la ZP delimitadas por un engrosado espacio perivitelino (EP); también son detectadas gotas lipídicas de varios tamaños.

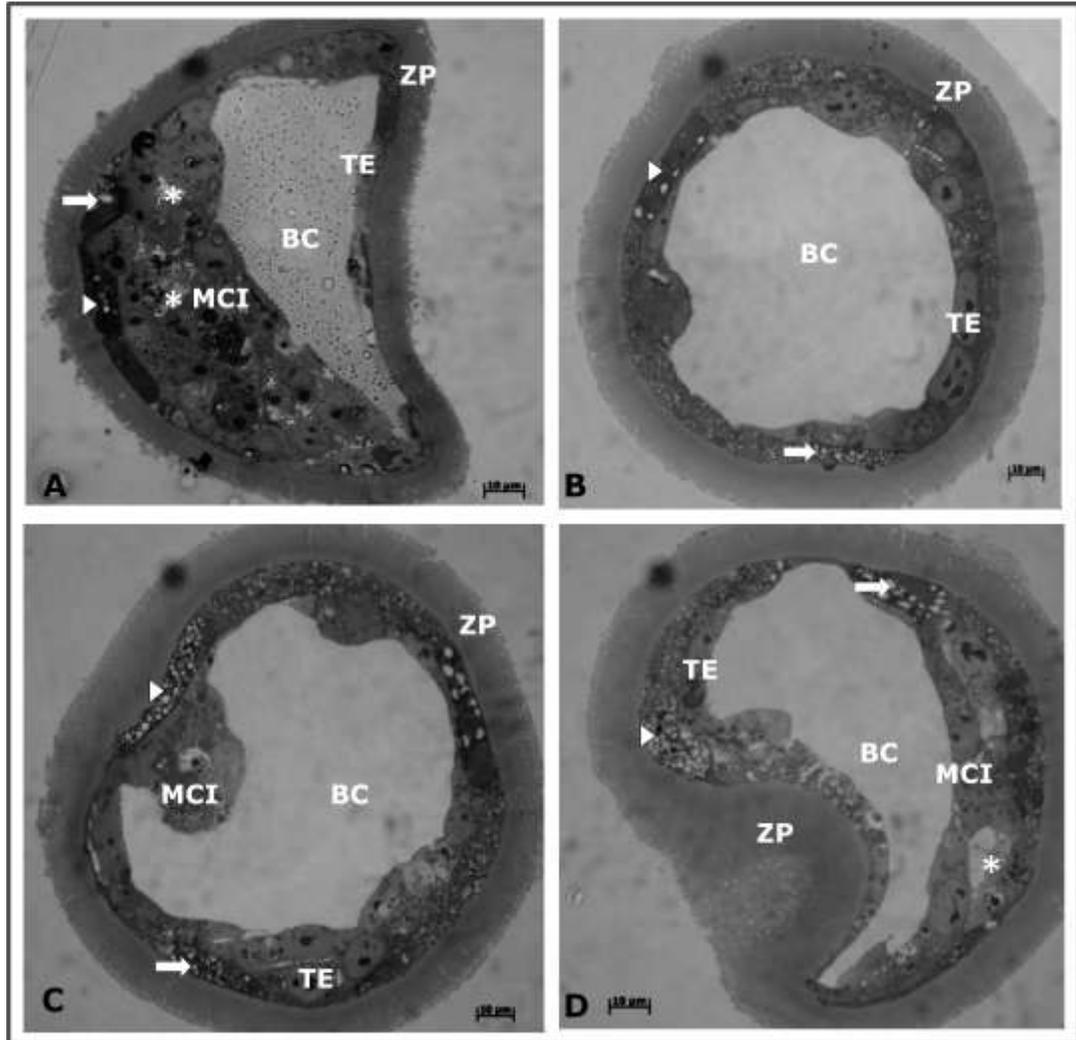


Figura 12. Micrografías de secciones semifinas (700 nm) de blastocistos bovinos frescos de día 8 de cultivo en medio mSOFaaci (1.000X): A) PVA, B) BSA, C) BSA+ 5% FCS y D) BSA + 1% FCS. Se muestra la zona pelúcida (ZP), blastocelo (BC), trofoectodermo (TE), masa celular interna (MCI), gotas lipídicas (flecha blanca), espacio perivitelino (cabeza de flecha blanca) y espacios intercelulares (*). Barra=10μm.

En las secciones ultrafinas (80 nm) observadas por MET (Figura 13 y 14), la mayoría de las células, de los cuatro grupos experimentales, muestran una apariencia normal, con un prominente EP, con vacuolas y abundantes gotas lipídicas. El TE se caracterizó por las células lisas que están estrechamente conectadas por complejos de unión apical que consisten en uniones estrechas. La membrana apical de las células del TE muestran abundantes MV. En el citoplasma se observan cisternas de REL poco desarrollado. Los AG son pequeños, que consta de pocas cisternas que se alcanzaron en las células de la MCI. Un gran número de gotas de lipídicas se distribuyeron por todo el citoplasma. Las mitocondrias, generalmente redondas u ovoide, abundantes y mostrando una matriz electrodensa y pocas crestas de forma lamelar y tubular.

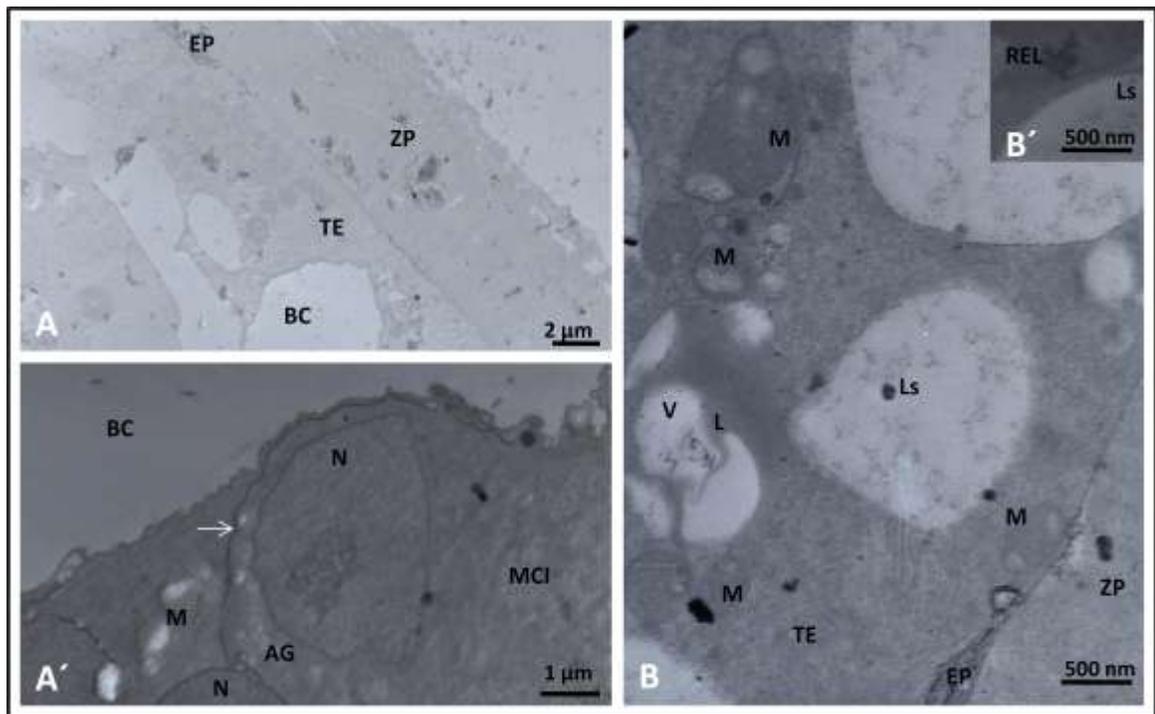


Figura 13. Micrografías de secciones ultrafinas (80 nm) de blastocistos bovinos frescos. Blastocistos producidos *in vitro* de D8 en medio mSOFaaci: A) PVA (X2.000), A´) células de la masa celular interna (MCI) (X5.000), B) BSA (X10.000) y B´) retículo endoplasmático liso (REL) y lisosomas (Ls) (x10.000). Zona pelúcida (ZP), células del trofoectodermo (TE), células de la masa celular interna (MCI), espacio perivitelino (EP), mitocondria (M), núcleo (N), gotas lipídicas (L), vacuolas (V), aparato de Golgi (AG), red de retículo endoplasmático liso (REL), rugoso (flecha blanca) y blastocele (BC).

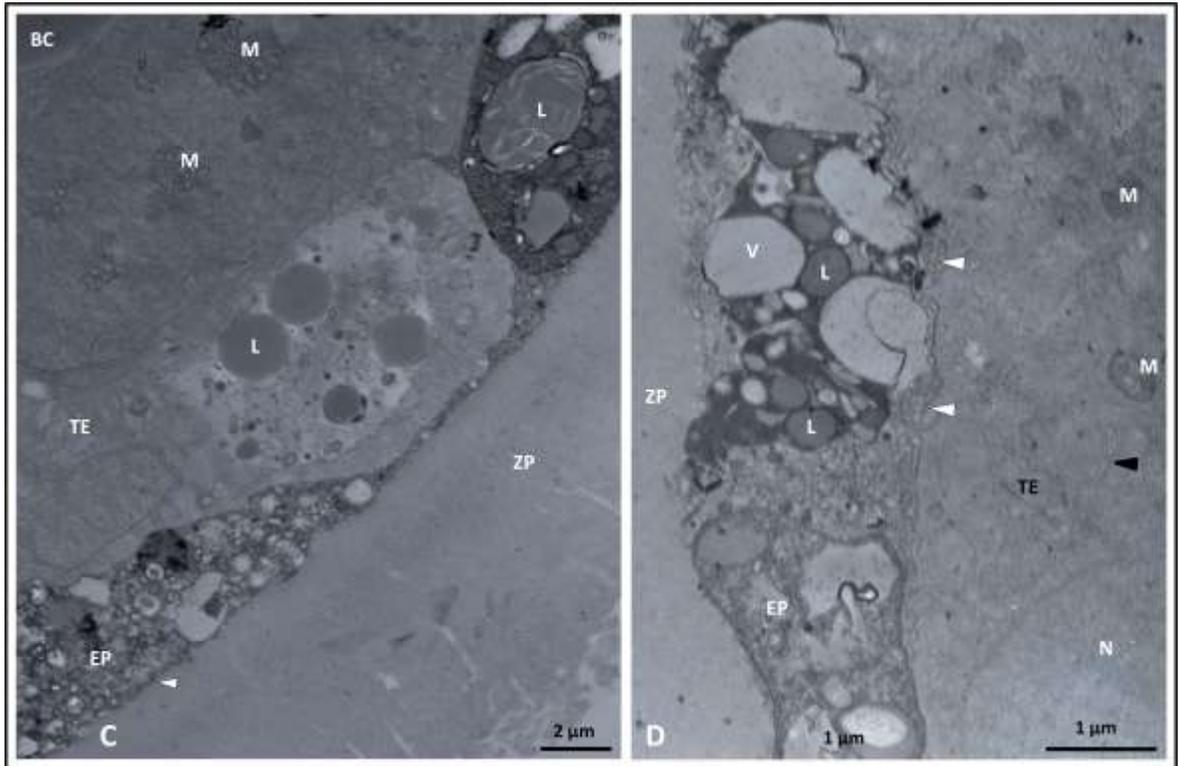


Figura 14. Micrografías de secciones ultrafinas (80 nm) de blastocistos bovinos frescos. Blastocistos producidos *in vitro* de D8 en medio mSOFaaci: C) BSA + 5% FCS (X3.000) y D) BSA + 1% FCS (X8.000). Zona pelucida (ZP), células del trofoectodermo (TE), microvellosidades (cabeza de flecha blanca), mitocondria (M), núcleo (N), gotas lipídicas (L), vacuolas (V), espacio perivitelino (EP), uniones estrechas (flechas blancas), red de retículo endoplasmático liso (REL) (cabeza de flecha negra).

Los sistemas de cultivo mSOFaaci + PVA (0,1 mg/mL) y mSOFaaci + BSA (6 mg/mL), mostraron el mayor número de blastocistos, menor cantidad de inclusiones lipídicas al igual que el menor número de núcleos apoptóticos. Por lo que fueron seleccionados para el siguiente experimento.

Experimento 2: Tasa de supervivencia y calidad embrionaria de blastocistos bovinos vitrificados en *fibreplug*.

Para este experimento se vitrificaron un total de 140 embriones, blastocistos y blastocistos expandidos de 7 y 8 d de cultivo, en contenedores *fibreplug* y fueron recuperados tras el enfriamiento un total de 130 (92,85%). La tasa re-expansión a las 2, 24 y 48 h de los blastocistos, tras el enfriamiento, no mostró diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los tratamientos (PVA y BSA), ni entre los estadios embrionarios (Tabla 11). En general, la menor tasa de re-expansión fue observada a las 48 h después del calentamiento. En la Figura 15, se observan los blastocistos re-expandidos después del proceso de calentamiento.

Tabla 11. Tasa de re-expansión de blastocistos bovinos vitrificados en *fibreplug*

mSOFaa	Estadio embrionario	Días de cultivo	No. de embriones calentados	Re-expansión (%)		
				2h	24h	48h
PVA	Blastocistos	7	16	10 (62,5)	9 (56,2)	6 (37,5)
		8	20	12 (60,0)	12 (60,0)	6 (30,0)
	Blastocistos Expandidos	7	12	7 (58,3)	7 (58,3)	5 (41,6)
		8	12	6 (50,0)	5 (41,6)	3 (25,0)
BSA	Blastocistos	7	18	8 (44,4)	10 (55,5)	7 (38,8)
		8	15	6 (40,0)	7 (46,6)	2 (16,6)
	Blastocistos Expandidos	7	15	6 (40,0)	8 (53,3)	6 (40,0)
		8	22	11 (50,0)	11 (50,0)	7 (31,8)

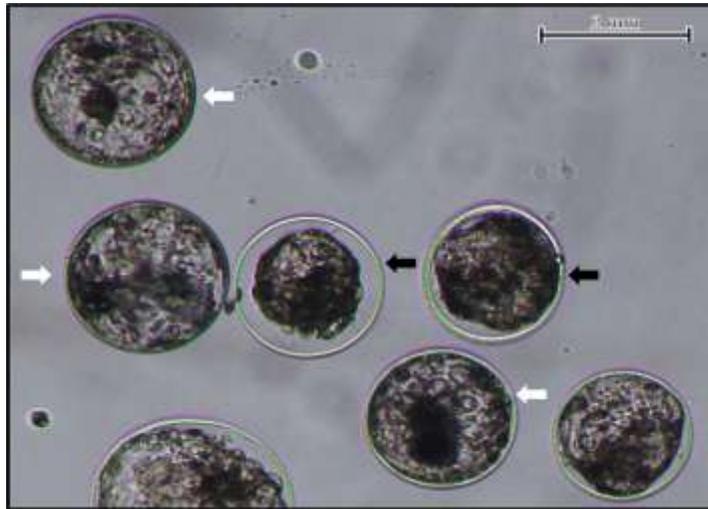


Figura 15. Blastocistos re-expandidos (flechas blancas) y no re-expandidos (flechas negras) (50X). Barra=2mm.

Calidad embrionaria después de la vitrificación

Después de 2 h de re-expansión, un total de 27 blastocistos de 7 y 8 d de cultivo fueron teñidos con el kit de apoptosis, incluyendo controles positivos y negativos. El grupo de blastocistos y blastocistos expandidos provenientes del medio con PVA, arrojaron el menor número de células apoptóticas ($P<0,05$) al compararlos con el grupo de BSA estudiados. No se observaron diferencias entre el número de células apoptóticas entre los grupos de blastocistos y blastocistos expandidos derivados del cultivo con BSA (Tabla 12).

El conteo de células totales mostró el valor más alto ($P<0,05$) para el grupo de blastocistos expandidos cultivados con BSA, mostrando diferencias entre los tres grupos restantes. El índice de apoptosis más bajo (14,7%; $P<0,05$) corresponde al grupo de blastocistos expandidos cultivados con PVA. El porcentaje de apoptosis, en el resto de los tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 12. Efecto del proceso de vitrificación sobre la calidad de blastocistos bovinos producidos *in vitro*

mSOFaaci	Estadio embrionario	Blastocistos, n	Núcleos apoptóticos, media ± DE	Núcleos totales, media ± DE	Índice de apoptosis, % ± DE
PVA	Blastocistos	6	17,3±1,4 ^b	82±4,1 ^c	21,2±2,2 ^a
	Blastocistos Expandidos	5	13,6±1,8 ^b	92,4±3,5 ^b	14,7±1,7 ^b
BSA	Blastocistos	5	22±3,2 ^a	97,8±3,0 ^b	22,5±3,2 ^a
	Blastocistos Expandidos	5	22,4±1,8 ^a	111,2±3,3 ^a	20,1±1,3 ^a

(^{a,b,c}): Valores en la misma columna con diferentes superíndices difieren significativamente (P<0,05).

Evaluación ultraestructural de blastocistos después de la vitrificación

Veinticinco blastocistos re-expandidos después de la vitrificación y las dos primeras h del calentamiento, fueron fijados para el análisis ultraestructural destinados a la MET, 11 corresponden al grupo de blastocistos y blastocistos expandidos de 7 y 8 d de cultivo del grupo PVA, 14 blastocistos al grupo de BSA y 8 blastocistos no re-expandidos, considerados como degenerados.

Durante el protocolo de fijación y deshidratación de los blastocistos, algunos de éstos sufrieron ruptura de su estructura, como se observan los blastocistos de la Figura 16 A y B. En los cortes de 700 nm, en este grupo de blastocistos, las células del TE no están adosadas estrechamente a la ZP, dejando mostrar el EP, junto con la aparición de restos celulares y células degeneradas.

A diferencia de los blastocistos frescos, los blastocistos re-expandidos y destinados a la MET, pocas células mantuvieron su morfología normal, caracterizadas por una morfología menos compacta y además, se detectó la pérdida de las uniones intercelulares. Se observó diferenciación entre el TE y la MCI; y un amplio EP con abundantes restos celulares. En el citoplasma, las mitocondrias se observan con una apariencia alterada y matriz altamente

dilatada, e incluso mitocondrias degeneradas, además de numerosas vacuolas, ausencia de MV y restos celulares (Figuras 18 y 19).

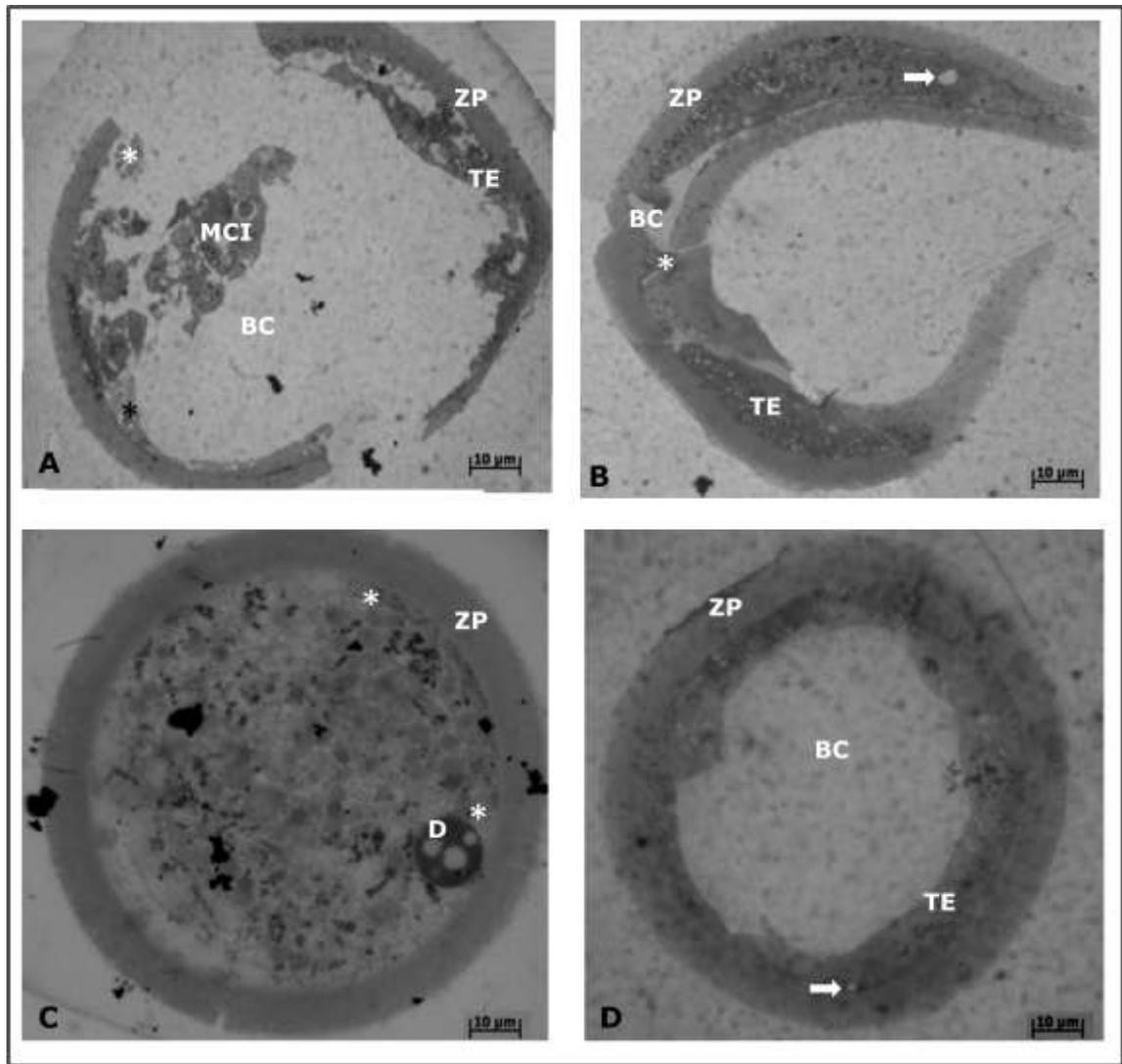


Figura 16. Micrografías de secciones semifinas (700 nm) de blastocistos bovinos re-expandidos y fijados dos h después de la vitrificación (1.000X). Blastocistos producidos *in vitro* en medio mSOFaaci + PVA: A) Expandido de 8 d de cultivo, B) BSA, C) BSA+ 5%FCS y D) BSA + 1% FCS. Se muestra la ZP (zona pelúcida), BC (blastocèle), TE (trofoectodermo), MCI (masa celular interna), gotas lipídicas (flecha blanca), células degeneradas (D) y restos celulares (*). Barra=10µm.

Se detectaron filamentos citoesqueléticos dispersos y con aparente asociación con las gotas lipídicas (Figura 18 A). En cuanto a los blastocistos no re-expandidos (80 nm), no se

muestra diferenciación entre la MCI y el TE, el BC está colapsado y contiene abundantes restos celulares. En estos embriones el EP está dilatado y ausencia de MV. Estas células se caracterizan por mostrar abundantes restos celulares, numerosas mitocondrias degeneradas, ausencia de uniones entre blastómeras, microfilamentos dispersos y aparición de espacios entre blastómeras degeneradas (Figura 20).

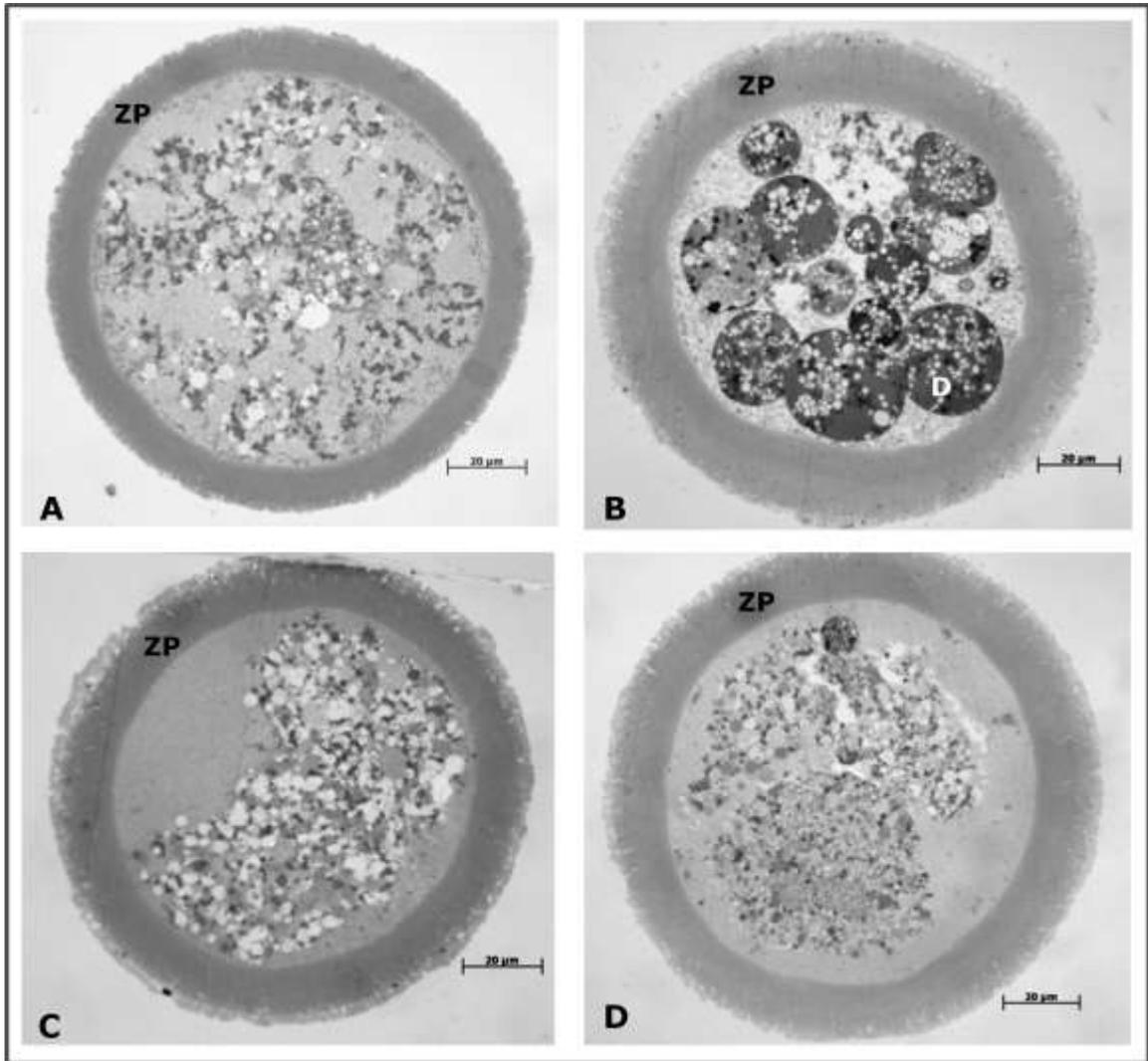


Figura 17. Micrografías de secciones semifinas (700 nm) de blastocistos bovinos no re-expandidos, fijados dos h después del calentamiento y clasificados como degenerados (1.000X). A y B) Blastocistos producidos *in vitro* en medio mSOFaaci + PVA; C y D) Blastocistos producidos *in vitro* en medio mSOFaaci + BSA. Zona pelúcida (ZP). Se muestra desorganización celular, blastómeras degeneradas (D) y colapso del blastocele. Barra= 20µm.

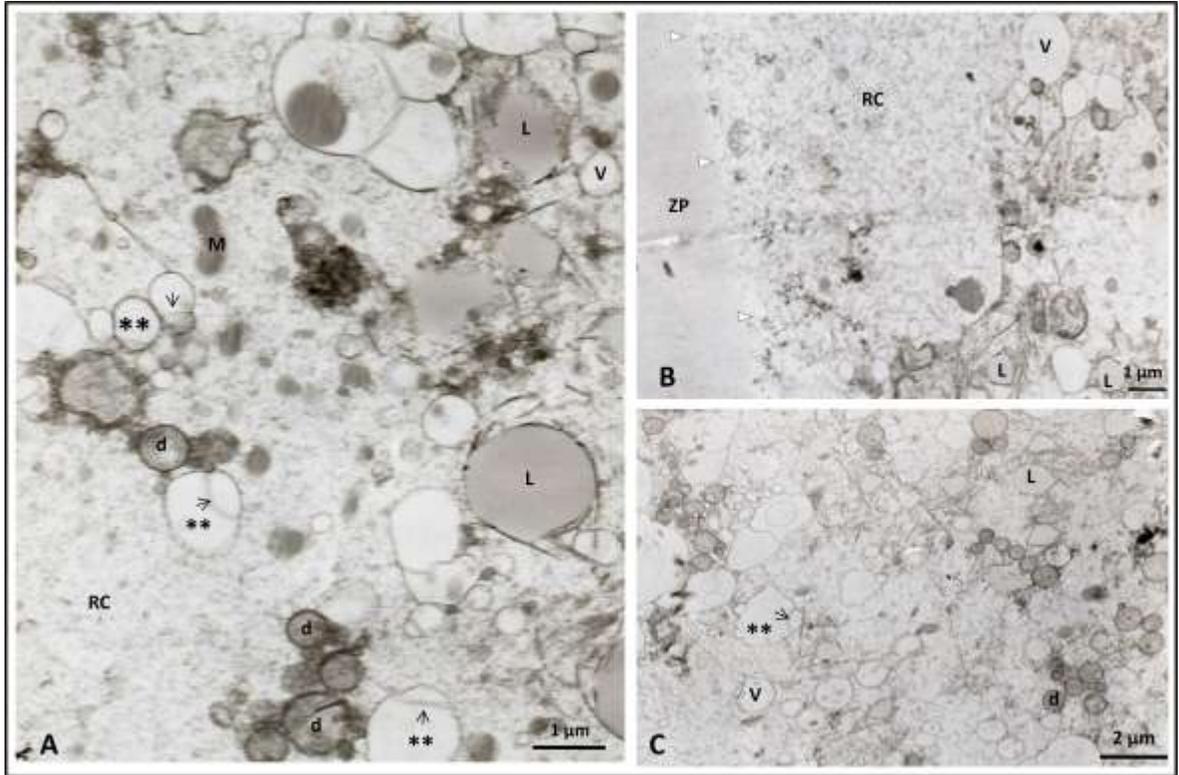


Figura 18. Micrografías de secciones ultrafinas (80 nm) de blastocistos bovinos re-expandidos y fijados dos h después del calentamiento. Blastocistos producidos *in vitro* en medio mSOFaaci + PVA: A) Blastocisto de 7 d de cultivo (X6.000), B) Blastocisto de 8 d de cultivo (X5.000) y C) Blastocisto expandido de 8 d de cultivo (X4.000). Abundantes restos celulares (RC), mitocondria (M), mitocondria degenerada (d), mitocondria con matriz dilatada (), y pocas crestas (flechas pequeñas), gotas lipídicas (L), lisosoma (Ly), vacuolas (V), zona pelúcida (ZP), pérdida de microvellosidades (cabeza de flecha blanca).**

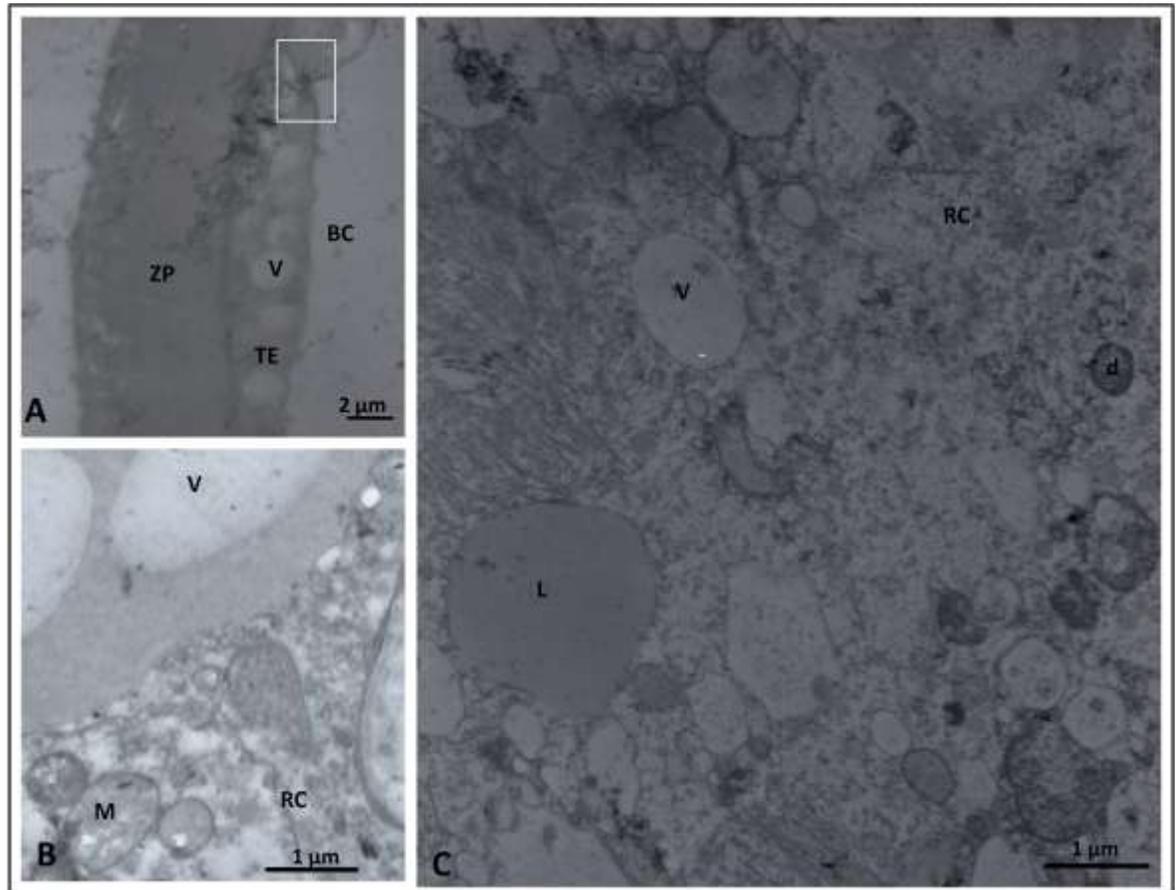


Figura 19. Micrografías de secciones ultrafinas (80 nm) de blastocistos bovinos re-expandidos y fijados dos h después del calentamiento. Blastocistos producidos *in vitro* en medio mSOFaaci + BSA: A) Blastocisto expandido de 8 d de cultivo (X2.500), B) Blastocisto expandido de 7 d de cultivo (X8.000) y C) Blastocistos de 7 d de cultivo (X8.000). Zona pelúcida (ZP), mitocondria (M), mitocondria degenerada (d), gotas lipídicas (L), vacuolas (V), abundantes restos celulares (RC), pérdida de unión entre blastómeras (cuadrado blanco).

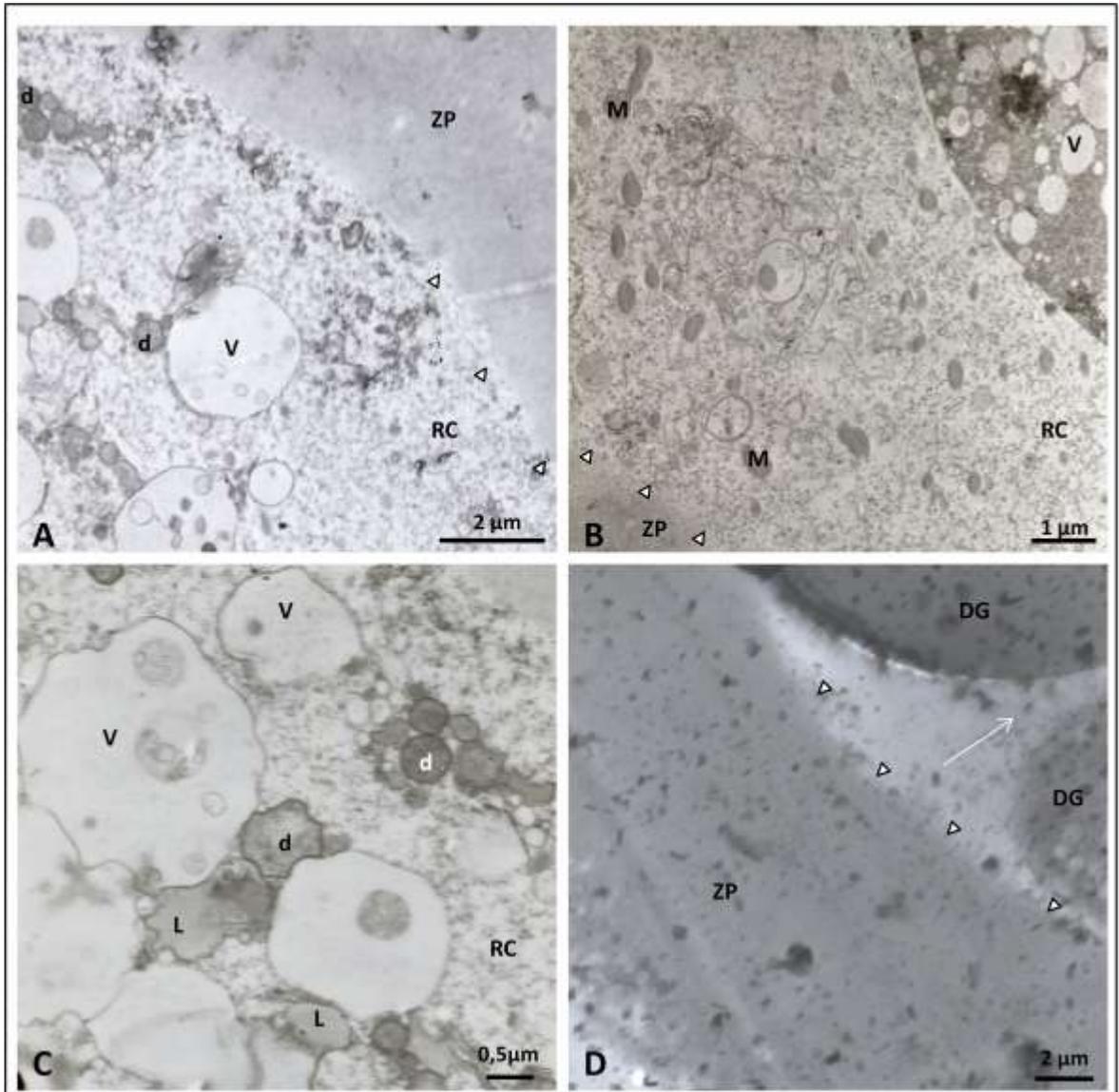


Figura 20. Micrografías de secciones ultrafinas (80 nm) de blastocistos bovinos no re-expandidos y fijados dos h después del calentamiento: Blastocistos del cultivo de PVA: A y B (X3.000 y X6.000, respectivamente). Blastocistos del cultivo en BSA: C y D (X10.000 y X3.000, respectivamente). Zona pelúcida (ZP), mitocondria (M), mitocondria degenerada (d), gotas lipídicas (L), vacuolas (V), abundantes restos celulares (RC), pérdida de microvellosidades y espacio perivitelino (cabeza de flecha blanca), blastómera degenerada (DG) y aumento de espacio entre blastómeras (flecha blanca).

En presencia de BSA, en el medio de cultivo para embriones bovinos mestizos, mostró el mayor número de núcleos apoptóticos. Por tal razón, el grupo de PVA se seleccionó para el último experimento.

Experimento 3: *Efecto del EGF sobre la supervivencia y calidad post-calentamiento de blastocistos bovinos PIV.*

En la tabla 13, se muestran los resultados de re-expansión y calidad embrionaria de blastocistos bovinos de 7 y 8 d, cultivados en el grupo de mSFOaaci + PVA y vitrificados para este experimento. Se recuperaron 72, para un total del 97,29% (72/74). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de re-expansión valoradas a las 2, 12 y 24 h, en ninguno de los tratamientos. Luego de 24 h del calentamiento, todos los blastocistos re-expandidos fueron seleccionados para la tinción con TUNEL.

Basado en esta tinción, el mayor número de células totales y apoptóticas fue observado en los blastocistos expandidos tratados con y sin EGF. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de apoptosis entre los tratamientos. A pesar de encontrar el menor índice de células apoptóticas en el grupo de blastocistos expandidos y expuestos a 50 ng/mL de EGF, no se encontraron diferencias entre éste y el resto de los tratamientos. En general, también se muestra una disminución del total de núcleos en los blastocistos en presencia o no de EGF.

Tabla 13. Efecto de la incorporación del EGF sobre la re-expansión y calidad de blastocistos bovinos producidos *in vitro* y vitrificados en *fibreplug*

mSOFaaci PVA	Embriones vitrificados, n	Re-expansión (%)			Calidad Embrionaria*		
		2h	12h	24h	Núcleos apoptóticos, media ±DE	Núcleos totales, media ± DE	Indice apoptosis % ± DE
EGF 0ng/mL	Blastocistos, 20	12 (60,0)	16 (80,0)	10 (50,0)	30,6± 4 ^c	69,8± 6,9 ^b	43,8±2,7
	Blastocistos Expandidos, 14	11 (78,5)	10 (71,4)	8 (57,14)	44,3± 4 ^a	94,7± 6,2 ^a	46,8± 4
EGF 50ng/mL	Blastocistos, 14	7 (50,0)	10 (71,4)	6 (42,8)	35± 2,9 ^{b,c}	71,5±6,2 ^b	49,0± 2,1
	Blastocistos Expandidos, 24	17 (70,8)	16 (66,6)	12 (50,0)	38,3± 5,8 ^{a,b}	90,5± 2,3 ^a	42,5± 7,1

* Número de embriones teñidos: 4-6.

(^{a,b,c}): Valores en la misma columna con diferentes superíndices difieren significativamente (P<0,05).

DISCUSIÓN

Son muchas las publicaciones que describen la producción de blastocistos bovinos bajo diversas condiciones y ofrecen una visión de la naturaleza del embrión preimplantacional (Jeon *et al.*, 2008; Plourde *et al.*, 2012; Herrera *et al.*, 2015). Estos estudios se centran principalmente en la morfología (Crosier *et al.*, 2001; Rizos *et al.*, 2002), composición química (Ferguson y Lesse, 1999), expresión de genes (Lonergan *et al.*, 2003; Stinshoff *et al.*, 2011; Plourde *et al.*, 2012), o bien, en el desarrollo de las técnicas emergentes en el campo de la tecnología de la reproducción asistida (Machaty *et al.*, 2012), que no necesariamente proporcionan información para la identificación del sistema más adecuado para la PIV con fines comerciales (Plourde *et al.*, 2012).

La actividad comercial y alimentaria, son las razones primordiales por las que la producción de embriones bovinos se practica en todo el mundo (Jo *et al.*, 2014). Una de las principales preocupaciones de los proveedores de embriones bovinos es el impacto de los sistemas de PIV sobre la calidad embrionaria (Plourde *et al.*, 2012; Ponter *et al.*, 2012). La eficiencia de los sistemas de PIV se ha definido principalmente en términos de porcentaje de embriones que han desarrollado una cavidad (aparición del BC) después de la fecundación (Plourde *et al.*, 2012).

El porcentaje de embriones que alcanzan el estadio de blastocistos es un parámetro que puede estar atrapado entre dos conceptos, a saber la calidad embrionaria y competencia para el desarrollo. Aunque estrechamente relacionados, estos conceptos pueden implicar diferentes factores. El primero, calidad embrionaria, deriva de la capacidad del microambiente para proveer el soporte adecuado que permita el desarrollo de un embrión saludable capaz de manejar el estrés, y más importante, establecer la preñez (Plourde *et al.*, 2012), mientras que el concepto de competencia para el desarrollo puede ser confuso (Duranthon y Renard, 2001).

En su forma más estricta, hace referencia al potencial intrínseco de experimentar el desarrollo. Potencial altamente dependiente de factores aún no identificados que podrían acumularse o que podrían ser funcionales durante la ovogénesis. El alcance y duración de

esta contribución materna aún no se ha aclarado (Sirard, 2001; Rizos *et al.*, 2005; Anguita *et al.*, 2007).

Para establecer diferencias entre estos dos conceptos, se concluye que la competencia para el desarrollo puede asegurar la existencia de un alto número de blastocistos de pobre calidad. Esta situación podría producirse, por ejemplo, en condiciones *in vitro* que promuevan el desarrollo de embriones débiles. En este caso, el empleo de sistemas de bajo rendimiento productivo, podría ser justificado para eliminar embriones comprometidos, incrementándose la calidad de los embriones producidos (Plourde *et al.*, 2012).

1. *Producción in vitro de embriones bovinos*

La PIV de embriones bovinos, después de la maduración, fecundación y cultivo *in vitro*, ha sido ampliamente mejorada, en especial en estos últimos años (Momozawa y Fukuda, 2011). A pesar de haber superado muchas de las dificultades que se presentaron en sus inicios, y de que muchos laboratorios han sido capaces de producir eficientemente embriones *in vitro* (Meirelles *et al.*, 2004), estos presentan un desarrollo y calidad más bajos que los obtenidos *in vivo*. Existen muchos factores que pueden interferir en el desarrollo normal del ovocito y del embrión (Warzych *et al.*, 2007).

Desde hace varias ya décadas, la obtención de ovocitos mediante la OPU o la aspiración de ovarios de hembras sacrificadas, se usan rutinariamente para la PIV de embriones bovinos. Varias investigaciones en bovinos indican que la característica de *buena* calidad ovocitaria es pre-requisito para el éxito en la producción de blastocistos (Hasler, 1998; Galli *et al.*, 2001; Merton *et al.*, 2003).

El uso de ovarios provenientes de matadero, representa una fuente importante de obtención de gametos para la investigación en reproducción animal bovina, pero también proporciona una heterogeneidad en los mismos, sobre todo si se considera la edad de la hembra donante (Rizos *et al.*, 2005; Anguita *et al.*, 2007). La edad de la hembra donante de ovocitos es un factor importante que influye en la competencia de desarrollo del ovocito. Las anormalidades más comunes relacionadas con la edad incluyen: (a) fallo en el reinicio de la

meiosis, resultado ovocitos incapaces de ser fecundados, (b) errores en la meiosis que pueden ser compatibles con la fecundación y pueden conducir a anomalías genéticas que comprometen la viabilidad de los embriones, y (c) deficiencias citoplasmáticas que se muestran en varias etapas de desarrollo antes o después de la fecundación. En general, los ovocitos de hembras jóvenes y los embriones derivados de ellos parecen ser más débiles y menos tolerantes al manejo y condiciones sub-óptimas del cultivo *in vitro*, que los provenientes de hembras adultas (Armstrong, 2001).

Otros factores relacionados con la donante son la etapa del ciclo estral en el momento de la recuperación de los ovocitos, el estado folicular en relación con el crecimiento y maduración final, mestizaje (Merton *et al.*, 2003) o el estado nutricional (Bilby *et al.*, 2006). Todos estos son considerados factores biológicos que pueden actuar separadamente (Janowski *et al.*, 2012) o en conjunto en una misma donadora (Bols *et al.*, 2012). Esta podría ser una de las razones de la compleja heterogeneidad de los COC's recuperados de ovarios de hembras faenadas (Ferreira *et al.*, 2009), heterogeneidad que podría haber afectado negativamente su potencial desarrollo embrionario (Krisher, 2004).

Por otro lado, existen los llamados *factores técnicos*, entre ellos: la temperatura y tiempo de almacenamiento de los ovarios recién colectados (Guemra *et al.*, 2014), la aguja y el vacío de aspiración empleado, relacionados con las técnicas y procedimientos necesarios para la obtención de ovocitos inmaduros antes de la PIV, podrían comprometer la calidad ovocitaria (Goovaerts *et al.*, 2010). Si bien las condiciones de obtención y la calidad de los COC's son importantes para alcanzar un mayor rendimiento de la PIV de embriones bovinos (Bilodeau-Goeseels y Panich, 2002), existen algunas evidencias que sugieren que el periodo de MIV ejerce un fuerte impacto sobre la eficiencia de la técnica y la calidad de los embriones obtenidos (Balasubramanian y Rho, 2007).

La calidad intrínseca del ovocito, se considera determinante en la proporción de ovocitos que llegan hasta el estadio de blastocisto (Gilchrist y Thompson, 2007). Así, uno de los grandes desafíos en el campo de la biología de la reproducción, es el entendimiento de la capacidad de desarrollo del ovocito, que hace referencia a los cambios bioquímicos y

moleculares que lo capacitan para madurar, ser fecundado y llegar hasta el estadio embrionario (Goovaerts *et al.*, 2010; Aardema *et al.*, 2013). Dado de que la capacidad de desarrollo de los ovocitos está determinada por varios factores, Goovaerts *et al.* (2010), manifiestan que existe la necesidad urgente de contar con procedimientos de evaluación de calidad ovocitaria adicionales a la morfológica y de naturaleza no invasiva. La capacidad de desarrollo embrionario en cultivos individuales, generará una nueva visión de la calidad intrínseca del ovocito, lo que conduciría a la identificación de prometedores parámetros morfológicos y de calidad en el ovocito.

Hasta ahora, la conformación de células del *cumulus* intactas y citoplasma homogéneo, es el único criterio de selección y clasificación ovocitaria que se realiza inmediatamente después de la aspiración de los folículos (Bilodeau-Goeseels y Panich, 2002; Wit y Kruip, 2001; Ohlweiler *et al.*, 2013). Aunque existe una lista de parámetros que pueden determinar la calidad ovocitaria, son métodos invasivos y no son morfológicamente evaluables (cantidad de RNAm, metabolismo y la distribución de mitocondrias, por nombrar algunas; Goovaerts *et al.*, 2010, 2011; Bunel *et al.*, 2015).

Existen otros protocolos de evaluación morfológica, como el propuesto por Jeong *et al.* (2009), que se basa en la coloración del citoplasma ovocitario y su relación con el contenido lipídico como parámetro de selección. También está el planteado por Jeon *et al.* (2008), quienes afirman que la expresión de la survivina, proteína inhibidora de la apoptosis, PIA (16,5 KDa; Ambrosini *et al.*, 1997) y reguladora de la división celular, que está altamente presente en ovocitos bovinos inmaduros y MIV; además su nivel de expresión esta relacionada con la calidad de los COC's y las condiciones de MIV.

Anguita *et al.* (2007), valoraron la incidencia de apoptosis mediante la tinción con Annexina-V junto al TUNEL en COC's antes y después de la maduración *in vitro*. Métodos que junto al descrito por Tosti *et al.* (2000), evalúan la cantidad de Ca^{2+} durante la progresión meiótica, pueden ser empleados para evaluar, en principio, la calidad y respuesta fisiológica y molecular de ovocitos bovinos provenientes de hembras mestizas

(*Bos taurus indicus*), y posteriormente, como métodos de selección de ovocitos destinados a la PIV de embriones.

La maduración nuclear, citoplasmática y de la ZP, son procesos indispensables y que conjuntamente determinan la maduración completa del ovocito, y que se traducen en cambios en las células del *cumulus*, aspecto de la ZP, membrana plasmática, citoplasma y material nuclear para lograr una fecundación normal (Plachot *et al.*, 1989). En cuanto a la MIV, existen dos parámetros que pueden ser predictivos de la competencia ovocitaria; el primero, la expansión de las células del *cumulus*, ampliamente utilizado de manera rutinaria en los laboratorios de FIV (Aardema *et al.*, 2013), y el segundo, la valoración de la progresión meiótica, análisis citogenético usado para la evaluación y progreso de la composición cromosómica de los ovocitos puestos a madurar *in vitro* (Sosnowski *et al.*, 1996).

Se sabe que el estadio de MII es el óptimo al evaluar el proceso de maduración *in vitro*, caracterizado por la presencia de la placa metafásica y el primer CP en el EP (Mandelbaum, 2000). Este se da por completado cuando se observa el mayor porcentaje de ovocitos en MII + CP y Telofase I (Sosnowski *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 2004).

En este trabajo se empleó el TCM-199, suplementado con piruvato sódico, FSH, 17- β estradiol y FCS, sin LH, la tasa de maduración obtenida fue del 68,06%.

En trabajos previos reportados por nuestro grupo de investigación, el análisis citogenético realizado en ovocitos bovinos provenientes de ovarios de hembras mestizas (*Bos taurus indicus*) y recuperados de matadero, reveló porcentajes de maduración que oscilaron entre el 52,75% (Rodríguez *et al.*, 2004), 54,07% (Carruyo *et al.*, 2010), 55,55% (Peláez-Gutiérrez *et al.*, 2012), 61,36% (Báez *et al.*, 2008), 68,85% (Báez *et al.*, 2010a), 69,0 % (Landinez *et al.*, 2010), y el 72,77% (Hernández-Fernández y Hernández-Fonseca, 2010).

Nagano *et al.*, (2013) y Huang *et al.* (2013), reportan tasas de maduración del 89,7% y 90,9%, respectivamente, en ovocitos madurados en ausencia de la LH. Luna *et al.* (2001),

reportaron un 80,3% de ovocitos bovinos madurados *in vitro*, utilizando 10% de FCS, 10 µg/mL de LH, 10 µg/mL de FSH. Por su parte, Rodríguez y Farin (2004), obtuvieron un 96% de ovocitos bovinos madurados, utilizando 10% de suero de vaca en celo, 10 µg/mL de LH, 5 µg/mL de FSH y 1 µg/mL de estradiol. Park *et al.* (2005), suplementó el medio de MIV con 10% de FCS, 10 µg/mL de LH, 1 µg/mL de FSH y 1 µg/mL de estradiol, y obtuvieron un 74,5% de ovocitos madurados hasta MII.

Ferreira *et al.* (2009a), obtuvieron un 80,3% de ovocitos bovinos MIV en MII, empleando 0,2 µM de piruvato, 0,5 µg/mL FSH, 5,0 µg/mL LH y 10% de FCS. Un 80,15% de ovocitos madurados fue reportado por Ohlweiler *et al.* (2013), utilizando un medio con 5 µg/mL de FSH, 50 µg/mL de LH y 10% de suero de yegua en celo. Tras 24 h de MIV, Barreto *et al.* (2007), publicaron un 60,2% de ovocitos maduros con 0,5 µg/mL de FSH y 100 UI/mL de la gonadotropina coriónica humana (hCG) en el medio TCM-199.

Coskun *et al.*, en 1991, logran obtener una tasa de maduración ovocitaria del 68% y, empleando un medio sin hormonas y 10% FCS, y un 79%, reemplazando el suero por 50 ng/mL de EGF. Carro *et al.* (2013), usaron un medio libre de gonadotropinas y suero, con la incorporación de 10 ng/mL de EGF y obtuvieron una tasa del 69%. Sosnowski *et al.* (1996), mostraron que el 77,3% de los ovocitos bovinos MIV se encontraron en MII, empleando gonadotropinas y 20% de suero. Resultados similares fueron obtenidos en otras experiencias: 77% (Hurtt *et al.*, 2000), 75% y 5,55% de ovocitos degenerados (Magnusson *et al.*, 2008).

Más recientemente, Asaf *et al.* (2014), tras 22 h de MIV en TCM-199 + 10% de FCS y 1,32 µg/mL de FSH, arrojaron una tasa del 70% de ovocitos maduros y 25% de inmaduros. Por su parte, Sprícigo *et al.* (2012), maduraron *in vitro* ovocitos bovinos provenientes de hembras mestizas en presencia de 10% de FCS y 10 mg/mL de FSH, y obtuvieron un 73,1% ovocitos maduros, 16,6% de inmaduros y 7,4% de degenerados, resultados comparables a los presentados en este estudio, puesto que se empleó el mismo protocolo de maduración. En el 2014, Sprícigo *et al.*, aumentaron la tasa de ovocitos maduros hasta un

80%, incorporando al medio de maduración: 10% de FCS, 0,01UI/mL de FSH y 0,1mg/mL de L-glutamina.

La mayoría de los protocolos utilizados para la MIV suelen incorporar (además de piruvato, estradiol, EGF y FCS) FSH y LH en el medio de maduración con el fin de estimular la meiosis. No obstante, los resultados obtenidos en los experimentos en los que se evalúan sus efectos durante la maduración *in vitro* son contradictorios (Zuelke y Brackett, 1990; Dominko y First, 1997; Choi *et al.*, 2001) y muy difíciles de comparar, debido a la naturaleza indefinida de los productos hormonales utilizados. Así, las hormonas utilizadas son de orígenes diversos, se obtienen empleando métodos de purificación diferentes y tienen grados de contaminación cruzada variables, todo ello impide obtener conclusiones claras (Choi *et al.*, 2001).

Algunos estudios en los que se utilizan medios semidefinidos indican que la suplementación con LH y FSH no ejerce ningún efecto favorable sobre la competencia de los ovocitos, ni sobre el número total de células que forman los blastocistos (Choi *et al.*, 2001). Esto se debe quizás a que los COC's bovinos poseen pocos receptores para la LH (Xu *et al.*, 1995; Manikkam *et al.*, 2001). Debido a esta carencia de receptores, la FSH, más que la LH, ha sido considerada como la gonadotropina clave en la consecución de la maduración *in vitro* de COC's bovinos (Rodríguez y Farin, 2004). Otros autores (Adriaens *et al.*, 2004; Sasson *et al.*, 2004; Hunzicker y Maizels, 2006; Silva *et al.*, 2006) indican que la FSH provoca la proliferación de células de la granulosa en el desarrollo preantral temprano, previene la atresia, promueve la producción de hormonas esteroideas en varias especies e induce la síntesis de receptores de LH.

Sin embargo, otros autores señalan que la presencia de FSH produce un efecto beneficioso, mientras que la LH no provoca efecto alguno (Van Tol *et al.*, 1996). Li *et al.* (2006), Pereira *et al.* (2007), Block *et al.* (2009), Isobe *et al.* (2012), Rasmussen *et al.* (2013), emplearon un medio de maduración para ovocitos bovinos similar al descrito en este trabajo, con FSH y estradiol como suplementos hormonales, obteniendo las siguientes tasas de producción de blastocistos: 15, 18, 17, 28 y 15%, respectivamente, resultados que

sugieren que no es indispensable el empleo de la LH para lograr obtener porcentajes de blastocistos que alcanzan la media reportada por otros autores.

Por otro lado, Nuttinck *et al.* (2004), demuestran que las células del *cumulus* expresan receptores para la LH y que su número aumenta entre las 6 y las 24 h de maduración *in vitro* (Assidi *et al.* 2010). Sin embargo, la presencia de la LH en el medio de maduración no incrementa la proporción de ovocitos que alcanzaron la metafase II (Dominko y First, 1997). Esta hormona, parece actuar a través de las células del *cumulus* llegando a mostrar cierto grado de diferenciación acompañado por una ligera apoptosis. Las células del *cumulus* son células especializadas y culminan su diferenciación después de la aparición del pico de LH. Esta diferenciación incluye cambios morfológicos (mucificación), mantenimiento y desarrollo celular necesarios para la contribución de estas células a la maduración ovocitaria (Tanghe *et al.*, 2002).

Las células del *cumulus*, son lugares de señalización intra y extracelular intensa. Estas vías de señalización incluyen, proteincinasa C (PKC), proteincinasa B (PKB), proteincinasa A (PKA), fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K), que son activas en las células del *cumulus* de ovocitos MIV en presencia de la LH (Russell y Robker, 2007). A nivel molecular, la LH está involucrada con la activación de varios genes en las células del *cumulus*, relacionados con la movilidad de los organelos intracelulares y transporte de membrana, importantes en la regulación de la entrada de proteínas, aniones y cationes (Assidi *et al.*, 2010).

In vitro, la FSH, promueve la maduración del ovocito mediante la activación de los receptores del EGF (EGFR; Wang *et al.*, 2012). Además, la FSH puede estimular la actividad secretora de las células del *cumulus* para producir el esteroide activador de la meiosis (MAS, siglas en Inglés), sustancia que estimularía la reanudación de la meiosis por vía paracrina (Byskov *et al.*, 1997). La producción de este factor activador de la meiosis puede estar relacionada con la activación de la PKC en las células del *cumulus*. En presencia de la LH y tras la unión a su receptor, disminuye la actividad del receptor peptídico natriuretico transmembrana 2 (NPR2, siglas en Inglés), posiblemente mediante la

activación del EGFR, lo que resulta de la disminución de GMPc, necesario para la reanudación de la meiosis (Liu *et al.*, 2013).

Otra molécula clave para el reinicio de la meiosis es el AMPc. Una disminución en los niveles de AMPc conduce a una reanudación prematura de la meiosis y una asincronía entre la maduración nuclear y citoplasmática (Webb *et al.*, 2002; Gilchrist y Thompson, 2007). Este conocimiento condujo al diseño de un sistema que estimula la maduración fisiológica ovocitaria (*Simulated Physiological Oocyte Maturation*, SPOM, siglas en Inglés), que consta de un prolongado periodo de maduración con un retraso de la maduración nuclear por la adición de sustancias que mantienen altas concentraciones de AMPc en el ovocito (Albuz *et al.*, 2010).

Guimarães *et al.* (2015), aplicaron el sistema SPOM para los ovocitos bovinos durante el protocolo de MIV concluyendo que el SPOM adaptado a diferentes sistemas de maduración no mejoró el desarrollo de los embriones PIV debido quizás a la baja concentración de FSH, por lo que se requiere una dosis alta de esta hormona para inhibir los efectos de la cilostamina, un inhibidor de las fosfodiesterasas de AMPc (Albuz *et al.*, 2010).

Actualmente, existe la posibilidad de utilizar hormonas de origen recombinante. Estas sustancias son de mayor pureza y no están contaminadas con otras moléculas, como sucede con las obtenidas a partir de extractos hipofisarios, suero u orina utilizando técnicas de purificación. Los experimentos realizados por Anderiesz *et al.* (2000), indican que la suplementación del medio de maduración con r-hFSH o con r-hLH no provocaba ningún efecto beneficioso.

Sin embargo, cuando se combinaban ambas en una proporción 1:10 aumentaba la maduración meiótica y la competencia de los ovocitos para soportar desarrollo. Por el contrario Izadyar *et al.* (1998), observaron que la inclusión de r-hFSH en el medio de maduración incrementaba los porcentajes de división y de blastocistos, atribuyendo este último efecto a que mejoraba la maduración citoplasmática, dado que los porcentajes de ovocitos en metafase II no variaron.

Por su parte, Iga *et al.* (1998), reportan que la adición de la GH en el medio de MIV de ovocitos bovinos promueve la maduración nuclear. Al igual que Izadyar *et al.* (1998a), afirman que las altas tasas de fecundación en bovinos es debido al efecto positivo de la GH sobre la maduración citoplasmática en ovocitos. Estos autores proponen que existe un efecto sinérgico entre la FSH y GH sobre la competencia del ovocito que se refleja en las altas tasas de división y desarrollo embrionario. En un estudio realizado en bovinos, Ali *et al.* (2005), postulan que el incremento de la capacidad de desarrollo del ovocito ocurre en respuesta al efecto de la rFSH y estradiol sobre la comunicación mediante las uniones *gap* entre las células del *cumulus* y el ovocito.

Kably *et al.* (2002), Ali *et al.* (2004), Park *et al.* (2005), Schoevers *et al.* (2005), Sagirkaya *et al.* (2007), Balasubramanian y Rho, (2007), Landínez *et al.*, 2010, Goovaerst *et al.* (2011) y Fakruzzaman *et al.* (2013), sugieren que el porcentaje de ovocitos en MII aumentaría si se emplea otras técnicas de selección ovocitaria y métodos para la MIV. En este sentido, Caínzos (2012), propone eliminar del medio de maduración las fuentes proteicas convencionales, cuya composición es indefinida y variable (FCS y BSA), y por ser sustancias muy complejas o estar contaminadas que convierten en indefinido cualquier medio que se les añada; proponen también el empleo de una atmósfera con menor concentración de O₂ (6%) del 20% habitual.

Cada vez toma más fuerza el uso del mSOF como medio candidato para la maduración ovocitaria (Ali *et al.*, 2004; de Castro e Paula y Hansen, 2007; Caínzos, 2012), en sustitución del tradicional TCM-199 (Galli *et al.*, 2003), que es un medio complejo, que contiene una gran variedad de sustancias que dificultan el estudio de las necesidades del ovocito bovino durante la maduración. Entre los suplementos al medio de maduración se encuentran: hormonas de origen recombinante, caracterizadas por su alta pureza (Accardo *et al.*, 2004), antioxidantes como: cisteína, cisteamina, glutamina y β-mercaptoetanol, su empleo se debe al aumento de los niveles de la enzima glutatión peroxidasa, reguladora de los ROS (Ali *et al.*, 2006; Merton *et al.*, 2013).

Wang y Keefe (2002), afirman que la incorporación de aminoácidos y cisteína, puede estimular satisfactoriamente la maduración citoplasmática. La incorporación de insulina, transferrina y selenio (ITS; George *et al.*, 2008) y triyodotironina (T₃; Costa *et al.*, 2013), al medio de maduración de ovocitos bovinos puede tener efectos beneficiosos sobre la cinética de desarrollo y proporción de embriones PIV. Recientemente, Wang *et al.* (2014), demostraron que la adición de resveratrol (potente antioxidante, una fitoalexina presente en las uvas) al medio de maduración *in vitro* aumenta la secreción de progesterona y disminuye la secreción de estradiol por parte de las células del *cumulus*, estimulando la expansión del *cumulus* y la formación del primer cuerpo polar en ovocitos bovinos, además de mejorar la proporción de blastocistos.

Más simple es la propuesta de suspender la incorporación de hormonas y aumentar la concentración de FCS (Anguita *et al.*, 2007; Goovaerst *et al.*, 2011). Carro *et al.* (2013), argumentan que la incorporación de ácido linoleico (ácido graso poliinsaturado) al medio de MIV mejora la criotolerancia de ovocitos y embriones al presentar mayor fluidez en la membrana plasmática por la incorporación de ácidos grasos insaturados, reduciendo el daño propiciado por la congelación.

Si bien, la tasa de ovocitos que alcanzan el estadio de MII es considerada un parámetro primordial para el posterior desarrollo embrionario, la tasa de ovocitos que alcanzan ser fecundados no es un hecho menos importante (Mandelbaum, 2000). Las altas tasas de fecundación, al igual que la de blastocistos PIV, dependerá de la calidad de los gametos y las condiciones de cultivo (Khurana y Niemann, 2000; Hansen *et al.*, 2010). En este trabajo el porcentaje total de fecundación a las 17 hpi, fue de 65,21%. Resultados superiores fueron obtenidos por Otoi *et al.* (1995) y Martino *et al.* (1996), que encontraron una tasa de penetración del 86,6 y 87%, respectivamente, en ovocitos bovinos madurados y fecundados *in vitro*. Otoi *et al.* (1997), reportaron un 86,9%; un 89% por Asada y Fukui (2000), y en el 2001, Hochi *et al.*, consiguen un 77% de ovocitos bovinos penetrados.

Por su parte, Hara *et al.* (2012), consiguen un 70%, y Ohlweiler *et al.* (2013), obtienen un 94,12% de penetración en ovocitos bovinos con el protocolo de FIV. Sprícigo *et al.* (2012),

reportan un 76,9% de ovocitos bovinos penetrados, proveniente de hembras mestizas y empleando un protocolo de FIV muy similar al de este estudio. Por su parte, Peláez-Gutiérrez *et al.* (2012), logran obtener tasas de penetración normal de 31,96% para el grupo predominantemente *Bos taurus* y 43,68% para el predominantemente *Bos indicus*, resultados que son similares a los obtenidos en este trabajo para la especie mestiza (*Bos taurus* x *indicus*), mientras que Báez *et al.* (2014), reportaron una tasa del 68,56% de ovocitos bovinos mestizos fecundados empleando el mismo protocolo de FIV de este trabajo.

Coy *et al.* (2005), manifiestan que las fallas en las tasas de fecundación se encuentran entre el 10 y 25% de ovocitos bovinos penetrados en la especie bovina. Plachot (2000), describe estos porcentajes como las anomalías más frecuentemente observadas en la FIV, entre ellas, falla en la formación de los pronúcleos y la aparición de cigotos triploides. Lonergan *et al.* (2006) aseguran que las tasas de fecundación normales superan el 50%. Según Parrish (2014), el número de espermatozoides añadido a los ovocitos durante la FIV afecta al porcentaje de ovocitos penetrados por los espermatozoides, e incluso incrementa la tasa de poliespermia. En tasas de fecundación que superan el 80%, la poliespermia comienza a aumentar, afectando las tasas de desarrollo embrionario. Ohlweiler *et al.* (2013), presumen que las tasas de poliespermia son considerablemente bajas en ovocitos de buena calidad, siendo estos más competentes para inducir el bloqueo a la poliespermia.

Huang *et al.* (2013) y Ohlweiler *et al.* (2013), manifiestan que la preparación de los espermatozoides para la FIV implica algún procedimiento para separar los espermatozoides del plasma seminal, suplemento y crioprotectores, ya que el semen contiene espermatozoides viables y otros, que por diferentes razones no serán capaces de fecundar los ovocitos.

En el trabajo realizado por Ardon y Suarez (2013) se analizó el efecto de la criopreservación sobre la morfología y función de las proteínas de unión al espermatozoide de toros (*binders of sperm proteins*, BSPs), proteínas que son secretadas por la vesícula seminal y que juegan un papel importante en la formación de depósitos de almacenamiento

de espermatozoides en el oviducto y en la capacitación espermática (Lefebvre y Suarez, 1996). EL estudio concluyó que la congelación altera la envoltura de las BSPs en el espermatozoide, lo que podría explicar, en parte, la reducción de la capacidad fecundante de los espermatozoides criopreservados.

Por su parte, Contri *et al.* (2013), afirman que los resultados de movilidad comprometida y bajas tasas de fecundación se deben a la calidad microbiológica del semen utilizado para la FIV. Las infecciones bacterianas conducen a un incremento del pH del plasma seminal y con el una reducción significativa de la movilidad a consecuencia de la disminución de la actividad mitocondrial. Estos mismos autores observaron que el ajuste del pH en los medios evaluación seminal entre 7 y 7,5, permitió obtener los valores más altos de viabilidad, actividad mitocondrial, movilidad total y progresiva en el semen de toro, y concluyendo que el pH de los medios podría ser considerado en todos los estudios en el que la evaluación de la movilidad es usada de manera rutinaria.

Más recientemente, Gualtieri *et al.* (2014), demostraron que la suplementación de los medios de espermatozoides con zinc, la coenzima Q10 (antioxidantes) y el micronutriente D-Aspartato (D-Asp), mejoran la competencia de desarrollo de los embriones producidos *in vitro*, con un aumento significativo del porcentaje de embriones mayores de 8 células y de blastocistos. Estos hallazgos enfatizan la necesidad obligatoria de evitar el estrés oxidativo asociado a la criopreservación de espermatozoides y la manipulación en la reproducción asistida.

A nivel de laboratorio, para obtener resultados repetibles en la FIV, es esencial contar con el mismo número de espermatozoides con el potencial para participar en la fecundación. Con el semen fresco, la mayoría de los espermatozoides son móviles y viables, por lo que simplemente la determinación de la concentración de espermatozoides y la adición de una cantidad fija son suficientes (Parrish, 2014). Aunque los espermatozoides congelados-descongelados proporcionan la ventaja de utilizar el semen del mismo toro, muchos espermatozoides mueren en el proceso de criopreservación, obteniendo resultados de motilidades después de la descongelación de un 30% a 70% (Parrish *et al.*, 1995).

El procedimiento de *swim-up*, también llamado *clean-up* (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1997), fue adaptado para evitar este problema, ya que los espermatozoides se depositan en la parte inferior de una columna de medio. La naturaleza densa del semen y el extendido de crioprotectores mantiene inicialmente estos espermatozoides en la parte inferior. A medida que pasa el tiempo, nadan hacia arriba para liberarse. Por ello, al separar sólo el medio superficial, se obtiene una población de espermatozoides que se aproxima al 100% de móviles y viables. No obstante, el número de espermatozoides recuperados de la técnica de *swim-up* con semen comercial suele ser bastante baja (Parrish, 2014).

Un sistema de gradiente de Percoll[®] similar a la utilizada con el semen humano se ha optimizado para el semen de bovino y se ha compartido con muchos laboratorios para su uso en la preparación de semen bovino para la FIV (Lee *et al.*, 2009). Cesari *et al.* (2006), afirman que el Percoll[®] muestra un mayor rendimiento de selección espermática y una mejora en la capacidad de producción de embriones bovinos cuando fue comparado con el método de *swim-up*; lo que puede ser atribuido a una mayor excitosis del acrosoma, asociado a la ausencia de ciertas proteínas de membrana.

Una comparación del método de Percoll[®] para la recuperación de espermatozoides con el método de *swim-up* fue también hecha por Parrish *et al.* (1995). La recuperación de espermatozoides móviles de semen descongelado fue de 9% para la técnica *swim-up*, pero con el gradiente de Percoll[®] se obtuvo el 40%. Esta mayor recuperación es la razón de que el Percoll[®] se emplee frecuentemente como método de separación espermática. Sin embargo, estos autores observaron que con el mismo número de espermatozoides, las tasas de FIV fueron mayores para la selección de espermatozoides por *swim-up* (Parrish, 2014), lo cual puede indicar que para obtener mayores tasas de embriones bovinos la mejor técnica de selección espermática es el *swim-up*.

Rizos *et al.* (2002a) y Holm *et al.* (2002), sugieren que la etapa de maduración y fecundación son los principales eventos que afectan al desarrollo embrionario. Pero la etapa de cultivo, el período más largo de la PIV, es el que tiene el mayor impacto en la calidad del blastocisto. La calidad del embrión en relación con su potencial de desarrollo es ahora

uno de los temas más importantes en la embriología moderna (Lechniak *et al.*, 2008; Plourde *et al.*, 2012; Zampieri *et al.*, 2013; Jo *et al.*, 2014; Salzano *et al.*, 2014).

Yadav *et al.* (1993) y Hartshorne (2000), afirman que en bovinos como en humanos, el momento de la primera división celular del cigoto es un parámetro valioso de la calidad intrínseca del embrión. Lechniak *et al.*, (2008) y Sugimura *et al.* (2012), sostienen que los cigotos que se dividen más temprano son más propensos a alcanzar mayores tasas de división y mayor número de blastómeras (>4 células), e incluso llegar a blastocistos que aquellos cigotos con división tardía.

Sirard *et al.* (2006), completan la idea anterior, aportando que la capacidad de división celular es la prueba más evidente del potencial y de la calidad de ambos gametos y del embrión en formación. Cuando la división no llega a ocurrir, puede ser consecuencia de la disfunción por parte del espermatozoide que falla en su función de activación del ovocito o que este no posee la habilidad o la competencia para llevar con éxito la primera división celular. La evaluación de cientos de ovocitos que no muestran división después a las 36 hpi indica que la mayoría no fueron fecundados y sólo una pequeña proporción mostró una descondensación incompleta del espermatozoide o pronúcleos asincrónicos.

El momento de la primera división junto con la proporción de cigotos que comienzan a dividirse se asocia con varios parámetros que pueden afectar el potencial de desarrollo de los embriones resultantes. El mecanismo que causa la variación de estos fenómenos no ha sido identificado, pero puede estar relacionado con la regulación genética, calidad de los gametos, o bien, con los factores ambientales e *in vitro* y las condiciones de cultivo (Van Soom *et al.*, 2003; Lechniak *et al.*, 2008).

Así, diferentes estrategias han sido utilizadas para formular medios exclusivos para la PIV de embriones, entre ellas: cambios en las condiciones de cultivo, variaciones en las concentraciones o momentos de inclusión de los componentes de los medios en el procedimiento *in vitro* (Tervit *et al.*, 1972; Gandhi *et al.*, 2000; Biggers *et al.*, 2004; Vandaele *et al.*, 2006). El éxito para cultivar embriones de mamífero se ha logrado gracias

a un mejor entendimiento de los requerimientos nutricionales obtenidos por alteraciones en las condiciones de cultivo (Barnett y Bavister, 1996).

Keskintepe y Bracket (1996), evaluando el establecimiento de sistemas de PIV con medios químicamente definidos, demostraron que la tasa más alta de embriones divididos, a las 48 hpi, fue de 80% con medio mSOF (citrato 0,5mM + aminoácido no esenciales) + 3 mg/mL de PVA + 10 mM de Hepes, seguido de un 75% de divididos con 1 mg/mL de PVA + 10 mM de Hepes. Más tarde, Holm *et al.* en 1999 y 2002, publicaron un 78% y $60 \pm 20\%$, de división respectivamente, empleando el medio mSOFaaci + 3 mg/mL de PVA.

La suplementación del medio de cultivo mSOFaac con PVA (1 mg/mL) arrojó un 68,45% de embriones divididos a las 48 hpi (Orsi y Lesse, 2004). Resultados similares también fueron obtenidos por Pereira *et al.*, (2007) con 69,7 % de división a las 48 hpi en medio mSOFaac + 3 mg/mL de PVA, mientras que Lim *et al.* (2007), obtuvieron una tasa de 78,6% (mSOFaac + 2,77 mM de myo-inositol + 0,1 mg/mL de PVA). Al igual que lo reportado en este trabajo (69,0% de división embrionaria, mSOFaac + 0,1 mg/mL PVA), Asaf *et al.* (2014), obtuvieron alrededor del 72% de embriones divididos en el medio optimizado simple de potasio (KSOM) con 0,1 mg/mL de PVA y 0,01 mM de ácido etilendiamino tetraacético (EDTA).

En los trabajos en los que se emplea la BSA, sistemas de PIV medianamente definidos, se observa un 84% y 83% de división embrionaria con medio SOF suplementado con 3 mg/mL y 16 mg/mL de BSA, respectivamente (Rizos *et al.*, 2003). Un 77% de divididos para el mSOFaaci + 6 mg/mL de BSA (Holm *et al.*, 1999). Un resultado similar al de este trabajo (64,8%), fue el reportado por Orsi y Lesse (2004), con 68,83% empleando un medio mSOFaac + 4% BSA. En el trabajo de Jo *et al.* (2014), usaron el medio Charles Rosenkrans con aminoácidos esenciales y no esenciales (CR1aa) + 3 mg/mL de BSA, obtuvieron un porcentaje del 64,9%, mientras que Lim *et al.* (2007), observaron un 78,6% de cigotos divididos con mSOFaac + 2,77 mM de myo-inositol + 8 mg/mL de BSA. Por su parte, Leivas *et al.* (2011), obtuvieron 76% de división (mSOFaaci + 4 mg/mL de BSA) con ovocitos bovinos provenientes de la técnica de OPU.

A pesar de la naturaleza indefinida y variable de la composición del suero, la incorporación en la etapa de CIV para embriones bovinos es ampliamente usada (Rizos *et al.*, 2003). En cuanto a la suplementación del medio SOF con porcentajes bajos de FCS (cercana al 1%), desde el día 1 de cultivo, como el implementado en este trabajo, son realmente escasos. Las proporciones de FCS aparecen a partir de 2% (Leivas *et al.*, 2011), 2,5% (Báez *et al.*, 2010; Sudano *et al.*, 2011, 2012; Ghanem *et al.*, 2014), 5% (Van Soom *et al.*, 2002; Anguita *et al.*, 2007; George *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2008; Sudano *et al.*, 2011, 2012; Demyda-Peyra's *et al.* 2012; Dovolou *et al.*, 2014) y 10% (Sagirkaya *et al.*, 2007; Sudano *et al.*, 2011; 2012; Costa *et al.*, 2013), alcanzando una tasa de división alrededor del 80% a las 48h (Holm *et al.*, 1999; Holm *et al.*, 2002; Duque *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2007; Sagirkaya *et al.*, 2007; Corrêa *et al.*, 2008; Leivas *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2013; Dovolou *et al.*, 2014).

A pesar de estos datos, los resultados de algunos otros trabajos (Pinyopummintr y Bavister, 1991; Lonergan *et al.*, 1999, Thompson, 2000; Gutiérrez-Adán *et al.*, 2001), apuntan a que la presencia de suero en el CIV inhibe el inicio de las primeras divisiones embrionarias, lo que se traduce en la disminución del porcentaje de división a las primeras 72 hpi. Es difícil concluir acerca de cuáles son los constituyentes del suero que presentan actividad embriotrófica (en términos de composición química), lo que representaría una fuente de variación capaz de tener un impacto significativo sobre la PIV de embriones (Mucci *et al.*, 2006a).

La presencia de glucosa en el FCS (a una concentración de 7 mM), incorporada en medio de cultivo, genera un efecto inhibitorio en los primeros estadios embrionarios (Takahashi y First, 1992), pero su utilización aumenta tras los primeros 3-4 ciclos de división celular embrionaria (Lane y Gardner, 2000; Thompson, 2000), pudiendo contribuir a las variaciones observadas entre los tratamientos de este trabajo. Con respecto a la cantidad de proteína en el FCS (85% más que la observada en el suero de animales adultos), poco se sabe acerca de la función de proteínas no específicas en el desarrollo embrionario. Su metabolismo podría producir amoníaco, el cual, dependiendo de su concentración y el

estadio embrionario, puede generar diferencias en cuanto la producción total de embriones (Hammond *et al.*, 2000).

Durante las primeras 72 h de cultivo el embrión metaboliza aminoácidos y produce iones amonio en gran cantidad, pudiendo producir un efecto tóxico. El medio de cultivo se debe adecuar a este tipo acontecimientos de manera de evitar generar en los embriones esta toxicidad. El NaCO₃ es usualmente adicionado a los medios de cultivo para asegurar una mejor regulación de pH (Keskinetepe *et al.*, 1995).

Los resultados del estudio de Pirestani *et al.* (2011), revelan que la presencia de EDTA en los primeros estadios puede jugar un papel beneficioso en el desarrollo de embriones bovinos, especialmente en la tasa de blastocistos. Aún se desconoce el mecanismo de acción del EDTA en el cultivo de embriones, pero en los medios esta sustancia puede crear complejos con metales pesados solubles en agua y no disociables, por lo que el EDTA podría neutralizar la toxicidad de los metales presentes en el medio de cultivo. Se recomienda su empleo durante los primeros tres d de cultivo, ya que posteriormente, puede producir una inhibición de la actividad glucolítica en los embriones (Nasr-Esfahani y Johnson, 1991; Gardner *et al.*, 2000; Gomez y Díez, 2000).

La implementación de un sistema de PIV utilizando medios químicamente definidos es el método de elección para el estudio y análisis de promotores e inhibidores del CIV en embriones bovinos (Momozawa y Kukuda, 2011) y las consecuencias en las etapas posteriores del desarrollo (Feugang *et al.*, 2009). Sin embargo, un sistema de CIV para los embriones de bovinos en un medio químicamente definido no se ha establecido plenamente (Momozawa y Kukuda, 2011). Para llegar a esto, se creen todavía mucho más necesarias las investigaciones sobre las alteraciones en la expresión de genes que conduce al desarrollo normal; es decir, la correlación entre los cambios en la expresión génica y sus efectos sobre el desarrollo del embrión y su (s) mecanismo (s) de regulación (Feugang *et al.*, 2009).

Los resultados de las tasas de blastocistos en este trabajo coinciden con los reportados en trabajos anteriores, en donde el cultivo de embriones bovinos en mSOFaaci + PVA (0,1 mg/mL) no incrementó las tasas de desarrollo aportadas por el mSOFaaci + BSA (6 mg/mL), incluso en presencia de aminoácidos esenciales y no esenciales, citrato y myo-inositol (Eckert *et al.*, 1998; Lonergan *et al.*, 1999; Kuran *et al.*, 2001; Wrenzycki *et al.*, 2001; Kuran y *col.*, 2002; Holm *et al.*, 2002). Asada *et al.* (2002) y Orsi y Lesse (2004), reportan que la reducción inducida por el PVA en las tasas de cavitación y de eclosión, está asociado con un número reducido de células del blastocisto.

Esto sugiere que los embriones cultivados en PVA pueden tener menor viabilidad (Lonergan *et al.*, 1999). Aunque en ciertos trabajos han obtenido terneros a partir de embriones cultivados con PVA, el medio en estos experimentos fue suplementado con citrato y myo-inositol, dos compuestos que restablecen la capacidad de desarrollo a niveles similares a los suplementados con BSA (Holm *et al.*, 1999).

En el trabajo realizado por Eckert *et al.* (1998), la suplementación con PVA alteró la utilización de sustratos energéticos en los blastocistos. En comparación con los embriones cultivados en presencia de BSA, los embriones cultivados en PVA mostraron un aumento en la utilización de piruvato, pero una disminución de su oxidación (Lee *et al.*, 1998).

Destinos posibles de este exceso de piruvato pueden ser la conversión a lactato para mantener un pH o potencial redox intracelular apropiado (Gibb *et al.*, 1997; Edwards *et al.*, 1998), la transaminación a alanina para eliminar el exceso de amoníaco (Partridge y Leese, 1996), la desintoxicación de peróxido de hidrógeno intracelular (O'Fallen y Wright, 1995) y la participación en el mantenimiento de los depósitos intracelulares de aminoácidos (Eckert *et al.*, 1998). Todos los factores previamente mencionados podrían encontrarse favoreciendo las condiciones del cultivo y por ende el mismo desarrollo embrionario.

Orsi y Leese (2004), plantean en su trabajo que la sustitución de la proteína en el medio de cultivo por el PVA conduce a diferencias en el metabolismo de aminoácidos. Una explicación para estas diferencias consiste en tomar en cuenta la composición de

aminoácidos de la BSA. Según los autores, antes mencionados, los embriones cultivados en PVA exhiben diferentes perfiles de aminoácidos que los cultivados con BSA, así como también muestran menores tasas de desarrollo y menor número de células, lo que podría justificar el porcentaje de división relativamente bajo en este sistema.

Por otro lado, la suplementación de los medios con BSA o FCS, como fuentes de proteínas, ha demostrado ejercer un efecto beneficioso sobre el desarrollo embrionario (Duque *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2007), así como el uso de otras macromoléculas sintéticas como el PVA (Gardner y Lane, 2014). Sin embargo, la habilidad de embriones para desarrollarse en un medio particular, no necesariamente indica que es un ambiente beneficioso o favorable, sino que simplemente refleja su capacidad para tolerar condiciones artificiales (Lonergan *et al.*, 2001).

Los resultados aportados en este trabajo, específicamente en el sistema comprendido por mSOFaaci + PVA, produjeron porcentajes de blastocistos y blastocistos expandidos muy similares a los sistemas constituido por mSOFaaci + BSA y BSA + 5% FCS, mostrando diferencias estadísticamente significativas con el tratamiento con BSA + 1% FCS. Esto puede deberse a que el PVA es bien conocido por ofrecer condiciones ideales de osmolaridad y pH al medio, además de poder tener un efecto directo en el embrión que sólo podrá ser apreciable después de la transferencia (Orsi y Lesse, 2004).

En este trabajo, al segundo grupo experimental se le incorporó la BSA como fuente proteica, alcanzándose una proporción de blastocistos de un 22% en el D7 y 23% en D8, resultados similares a los obtenidos por Trigo *et al.* (2011), Orsi y Leese (2004) y Asada *et al.*, (2002), con un 16,6% (BSA 3 mg/mL), 22% (BSA 4 mg/mL) y 20,7% (BSA 8 mg/mL), respectivamente. Lim *et al.* (2007), reportaron una tasa de blastocistos de 28% a los siete días de cultivo y un 13,26% de blastocistos eclosionados en D9, con 8mg/mL de BSA. Dovolou *et al.* (2014), muestran una tasa de blastocistos de 30% a los 8 días de cultivo en mSOF + 16 mg/mL de BSA.

Tasas inferiores fueron reportadas por Gómez *et al.* (2008), con un 3% de blastocistos (D7), suplementando el medio con 20 mg/mL de BSA. Estos autores, sugieren que la producción de embriones basada en la suplementación con BSA se caracteriza por un marcado retraso en el desarrollo embrionario. Thompson (2000), claramente demostró que la BSA juega un papel nutricional importante durante el desarrollo de blastocistos, específicamente después de la compactación. Aún así, es difícil reconocer el papel de esta proteína durante esta etapa, por su aporte de factores de crecimiento (Lim *et al.*, 2007).

En cuanto al uso del FCS, existen evidencias que han demostrado que una exposición prolongada de suero en el medio de cultivo puede alterar la morfología y bioquímica de los embriones bovinos (Abe *et al.*, 1999a; Fair *et al.*, 2001; Crosier *et al.*, 2000; 2001), al comparados con los cultivados sin suero (Shansuddin y Rodríguez-Martínez, 1994; Gardner, 1999).

Algunos autores observaron que la suplementación con suero se encuentra asociada a un menor grado de compactación de las mórulas (Abe *et al.*, 1999a). Esto podría deberse a alteraciones a nivel de los complejos de unión intercelulares en respuesta a la suplementación con suero (Shansuddin y Rodríguez-Martínez, 1994). Por otra parte, los trabajos de Rizos *et al.* (2003), Gómez *et al.* (2008) y Vandaele *et al.* (2006) y Pinyopummintr y Bavister (1994), demostraron que la incorporación del FCS después de 42, 47 y 72 hpi (24, 29 y 54 h de iniciado el CIV), respectivamente, o incluso en etapas más avanzadas proporciona los mejores resultados de producción de blastocistos. Estrategias metodológicas durante la etapa de CIV pueden contrarrestar o evitar los efectos inhibitorios por parte del FCS durante etapas iniciales.

En los mamíferos, otro factor determinante en el desarrollo embrionario, más allá de la etapa de blastocisto, supone la eclosión del embrión fuera de la ZP. Esta eclosión es un requisito necesario para que se pueda producir la implantación y la posterior gestación, y puede ser empleado como criterio para evaluar la viabilidad embrionaria (Lee *et al.*, 1997; Cuello *et al.*, 2007). Debido a que el mecanismo de eclosión depende en parte de la presión mecánica ejercida por el embrión en crecimiento, un embrión de mayor calidad,

presumiblemente de crecimiento más rápido, puede experimentar la eclosión (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1991) antes que otro de menor calidad. Por otro lado, se ha observado que el espesor y endurecimiento de la ZP deteriora la capacidad de eclosión en los embriones PIV lo cual contribuye a su baja tasa de implantación (Cohen *et al.*, 1992).

En humanos (Urman *et al.*, 2002) como en bovinos (George *et al.*, 2008), un correcto proceso de eclosión ocurre sólo en blastocistos de buena calidad, mientras que embriones de mala calidad, este proceso no tiene lugar. Sin embargo, en una publicación anterior, Fong *et al.* (2001), demostraron que el éxito de eclosión *in vitro* no se correlacionó con la calidad de los blastocistos, lo que indica que es posible rescatar a los embriones con problemas de eclosión a través de la eliminación de la ZP antes de su transferencia. Velásquez *et al.* (2013), demuestran que la eliminación de ZP, con pronasa en embriones bovinos PIV, no afecta el desarrollo temprano de embriones bovinos cuando se utiliza un sistema de cultivo que garantice el correcto contacto y compactación celular.

Por su parte, Leibfried-Rutledge *et al.* (1991), señalan que el momento de la eclosión podría ser relevante para aquellos blastocistos que lo hicieron durante los 8 d de cultivo. Pero en condiciones particulares, en medios químicamente definidos o condiciones controladas, la aparición de la eclosión podría aparecer a los 216 hpi, o bien, a los 9 d de cultivo (Holm *et al.*, 1999; Nedambale *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2007; Hochi *et al.*, 2010).

Otro de los factores ambientales responsables de la baja eficiencia de la técnica en relación con el porcentaje de blastocistos obtenidos *in vitro* y de la baja calidad de los mismos es la tensión alta de O₂ (>10-20%) (Wale y Gardner, 2010, 2013). Así, la exposición a la luz natural o artificial, unida a la mayor concentración de oxígeno durante el cultivo pueden inducir cambios en el metabolismo, desencadenando un desequilibrio entre la producción y eliminación de ROS. La tensión de O₂ es probablemente uno de los factores más importantes en la regulación de la proliferación celular y la diferenciación durante el período de desarrollo embrionario (Dalvit *et al.*, 2005).

Aunque la tensión de O₂ durante el tránsito oviductal se encuentra a un máximo del 9%, y con ella la aparición de la eclosión (Fischer y Bavister, 1993), este porcentaje está muy por debajo del 20% de O₂ que presentan algunas atmósferas (Yuan *et al.*, 2003). En los trabajos de Van Soom *et al.* (2002) y Yuan *et al.* (2003), reportaron una disminución significativa del porcentaje de blastocistos eclosionados expuestos a 20% de O₂ comparados con el 5% de O₂.

Bilodeau-Goeseels y Panich (2002), indicaron que la ausencia de blastocistos eclosionados podría estar directamente asociada a la alta tensión de O₂ (20%). Estos efectos negativos se pueden aliviar con éxito con el uso de una atmósfera de oxígeno reducida durante todo el período de preimplantación (Wale y Gardner, 2013).

2. Contenido lipídico de embriones bovinos producidos in vitro

El establecimiento de un sistema de control de calidad en los laboratorio de embriología es un requisito indispensable para alcanzar resultados repetibles y exitosos. Los tipos de pruebas realizadas para este propósito han sido el centro de muchas discusiones. El control de calidad no debe limitarse a los medios de cultivo utilizados, sino a pruebas que indiquen si las condiciones ambientales y de manejo son las adecuadas en los procedimientos de FIV (Gardner y Lane, 2014). En este sentido, los resultados del trabajo de Sugimura *et al.* (2012), demostraron que el momento de la primera división celular, el número y calidad de blastómeras, el cariotipo y el consumo de oxígeno, podrían proporcionar una selección objetiva y fiable de los blastocistos más saludables.

Pereira y Marques (2008) y Ghanem *et al.* (2014), proponen sumarle a la lista anterior, la valoración de contenido lipídico, ya que la acumulación de lípidos en los embriones PIV se ha relacionado con la calidad y la viabilidad tras la criopreservación (Abe *et al.*, 2002; Sudano *et al.*, 2011), ya que diferentes tipos de lípidos juegan un papel importante en numerosos procesos celulares.

La acumulación de lípidos en embriones ha sido evaluada con métodos cuantitativos como la cromatografía líquida de alta eficacia (siglas en Inglés, HPLC), la cromatografía de gases y de capa fina. Estas técnicas aunque precisas, requieren equipamientos costosos y un pool de hasta 1000 embriones (Barceló-Fimbres y Seidel, 2011). Por lo que al comparar los resultados del contenido de lípidos medida a través de cada una de las técnicas, parece claro que la selección de una de ellas dependerá del objetivo de estudio.

Para realizar comparaciones entre el contenido lipídico y la actividad mitocondrial, el método de análisis de preferencia es la coloración con rojo de Nilo, con cualquier *software* que transforme las imágenes obtenidas por escala de grises, intensidad de fluorescencia y representadas en unidades arbitrarias (Image J 1.41, AUTOCAD, Adobe Photoshop Actendex). Teniendo además en cuenta la herramienta de los métodos enzimáticos y colorimétricos para la cuantificación ácidos grasos; mientras que para evaluar el impacto del contenido lipídico sobre la criopreservación, la metodología recomendada es la tinción de Sudan Black B, o bien, la espectrometría de ionización de masas, si el propósito es detectar la presencia y cantidad de una molécula de naturaleza grasa en particular.

Desde el punto de vista celular y metabólico, los lípidos parecen ser una importante fuente de energía para los ovocitos durante la maduración, fecundación, y división temprana en embriones bovinos (Ferguson y Leese, 1999; 2006). Por ejemplo, los ovocitos de cerdo pueden usar los triglicéridos intracelulares como fuente de energía (Tsuji *et al.*, 2001; Romek *et al.*, 2009, 2010) y la proporción de fosfolípidos y colesterol pueden influenciar las propiedades físicas de las membranas biológicas (Romek *et al.*, 2010). Finalmente, los lípidos juegan un papel en la señalización intracelular y son sustratos para diferentes hormonas y prostaglandinas (Romek *et al.*, 2009).

Los blastocistos bovinos PIV tienen citoplasmas más oscuros que los embriones producidos *in vivo* como consecuencia de la alta acumulación de lípidos (Pollard y Leibo, 1994; Abd El Razek *et al.*, 2000); esto se asocia con una alteración de la calidad del embrión, y una reducida criotolerancia (Hill y Kuehner, 1998; Rizos y Fair, 2002). Algunos estudios expresan que la acumulación de gotas lipídicas en el citoplasma de embriones bovinos puede estar influida

por las condiciones del cultivo (Barceló-Fimbres y Seidel, 2011). La reducción de los lípidos embrionarios podría conseguirse modificando la composición de los medios de cultivo (Abe *et al.*, 2002; Ghanem *et al.*, 2014).

Así por ejemplo, la eliminación del suero o su sustitución por la BSA o PVA en los medios de cultivo de embriones bovinos da lugar a la obtención de embriones con menor cantidad de inclusiones lipídicas o gotas de menor tamaño (Gómez *et al.*, 2008). Esta afirmación coincide con los resultados obtenidos en este trabajo, puesto que los embriones del tratamiento mSOFaaci + PVA y BSA presentaron una cantidad de gotas pequeñas y grandes muy similares. Pereira *et al.* (2007), con ayuda de una cámara de Nomarski comprobaron que el grupo de blastocistos bovinos de 8 d de cultivo en PVA presentaba el menor contenido lipídico comparados con los tratamientos que fueron suplementados con 10% de FCS.

No obstante, en este trabajo, el mayor número de gotas lipídicas pequeñas fue aportada por los blastocistos del tratamiento con mSOFaaci + BSA + 1% FCS, mientras que el mayor número de gotas grandes aparecen en presencia de 5% FCS ($P < 0.05$). Estos resultados coinciden con lo obtenido por Sudano *et al.* (2011, 2012a), quienes reportaron, con el mismo método de valoración utilizado en este estudio, que el incremento de las concentraciones de FCS en el medio de cultivo de embriones (5% y 10%) causó un aumento del número de gotas lipídicas medianas y grandes en su citoplasma. Abe *et al.* (2002), afirman que la presencia de FCS desde el inicio del cultivo, y no otro componente, es la causa de las diferencias en el desarrollo observada en los embriones PIV, con una aparición de una gran cantidad de gotas pequeñas.

Varias investigaciones (Abe *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2007; Sudano *et al.*, 2011, 2012, 2013) apoyan esta técnica de valoración de lípidos, por ofrecer una información adicional y de gran importancia a la criotolerancia de los blastocistos PIV, al tomar en cuenta que una gota grande equivale a ocho gotas medianas, o lo que es igual, a 512 gotas pequeñas.

El análisis del contenido lipídico de embriones bovinos, a través de la tinción fluorescente del rojo de Nilo (Nile Red, SIGMA), utilizada por Leroy *et al.* (2005), mostró un mayor índice de positividad (unidades arbitrarias de fluorescencia) en embriones cultivados en presencia de suero. Igualmente, Ghanem *et al.* (2014), observaron que en presencia de FCS (2,5%) se exhibe mayor contenido de lípidos pero menor actividad mitocondrial, mientras que en presencia de PES y LC, los resultados fueron totalmente contrarios. En embriones de cerdo, Romek *et al.* (2011) aclaran que la presencia de agentes químicos que ayuden a reducir el contenido lipídico está estrechamente vinculada con el aumento de la actividad mitocondrial, fenómeno que puede ir acompañado del aumento de oxidación de ácidos grasos (Tsujii *et al.*, 2001).

Los mecanismos y la fuente de acumulación de lípidos citoplasmáticos en embriones bovinos cultivados con FCS son bastante complejos y aun no están claros (Abe *et al.*, 2002). Un estudio basado en la expresión génica de blastocistos *B. taurus* y *B. indicus*, producidos *in vivo* e *in vitro*, reveló que blastocistos PIV presentan sobreexpresión de genes que participan en la captación de lípidos del medio extracelular.

En blastocistos *B. taurus* se observó sobreexpresión de genes que previenen la apoptosis y regulan la elongación de ácidos grasos insaturados, lo que podría guardar relación con el mayor contenido de este tipo de ácidos grasos en dichas subespecies; mientras que los blastocistos *B. indicus* mostraron sobreexpresión de genes relacionados con el incremento del estrés oxidativo, lo que podría explicar uno de los aspectos que provocan menor criotolerancia en embriones *B. indicus* (Sudano *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que las células en cultivo pueden tomar fácilmente ácidos grasos, fosfolípidos y TAG de los medios suplementados con suero (Spector, 1973). Las lipoproteínas presentes en el suero pueden ser internalizadas por las células embrionarias incrementando el contenido de lípidos citoplasmáticos (Sata *et al.*, 1999; Shamsuddin y Rodríguez-Martínez, 1994; Thompson *et al.*, 1995).

Otro de los mecanismos es que los embriones podrían ser inducidos a llevar a cabo una síntesis de *novo* de TAG producto de la presencia de suero (Razek *et al.*, 2000; Ferguson y Leese, 1999), provocando además la formación prematura del BC, fragmentación y degeneración de las mitocondrias (Thompson *et al.*, 1995). Además de los defectos metabólicos, la acumulación de lípidos incrementa el volumen celular y puede suponer un problema osmótico para el embrión (Ferguson y Leese, 1999).

El número de gotas lipídicas decrece durante el desarrollo embrionario, debido a que los lípidos pueden ser liberados de sus reservas durante la formación del blastocisto (Romek *et al.*, 2010). Estas reservas lipídicas están previstas como organelos citoplasmáticos metabólicamente activos que proporcionan una importante fuente endógena de energía. La disminución, en general, del contenido de grasa durante la formación del blastocisto puede explicarse por su utilización, principalmente por las células del TE, vía β -oxidación, expansión del BC y eclosión (Sturme y Leese, 2003).

En los embriones PIV, el incremento de las gotas lipídicas y su distribución uniforme en las células de TE y MCI, puede indicar un desbalance en el metabolismo de las mitocondrias, con la poca utilización del reservorio de grasa (Sudano *et al.*, 2012). Este último hecho, también puede estar asociado a una saturación de *PLIN3*, proteína citoplasmática encargada de la formación y regulación de las gotas lipídicas, conllevando a un desbalance en el patrón de distribución de estas reservas energéticas sobretodo en embriones PIV. Estas proteínas, *PLIN1,2,3,4*, podrían ser útiles para la reducción del contenido lipídico corrigiendo la acumulación anormal que pueda ocurrir en los blastocistos PIV, la cual puede causar daños durante la criopreservación (Sastre *et al.*, 2014).

Otra vía para aumentar el éxito de la PIV, es el estímulo del metabolismo lipídico *in vitro*, debido a la importancia de la β -oxidación de ácidos grasos para el desarrollo embrionario. Al ser la carnitina una molécula limitante en el proceso de oxidación de ácidos grasos, la suplementación del medio de cultivo con ésta induce el incremento de la β -oxidación (Dunning *et al.*, 2010), aumenta el contenido de ATP en el ovocito e induce la redistribución de gotas lipídicas (Chankitisakul *et al.*, 2013), mientras que la

suplementación durante el desarrollo embrionario favorece la β -oxidación y con ello la disminución del número de gotas lipídicas, produciendo un aumento en la tasa de blastocistos (Sutton-McDowall *et al.*, 2012). En contraste, la inhibición de la β -oxidación bajo condiciones de saturación de ácidos grasos no esterificados favorece el incremento de la tasa de blastocistos (Van Hoeck *et al.*, 2013).

Por su parte, Pereira *et al.* (2007), señalan que el cultivo de embriones bovinos en presencia de ácido linoléico conjugado (siglas en Inglés, CLA) y FCS, reduce notablemente el contenido lipídico durante el CIV. Aunque el mecanismo de reducción no está del todo claro, se dice que el CLA actúa sobre los adipocitos para reducir la síntesis y captación de ácidos grasos. El CLA, inhibe la expresión de varios genes que codifican enzimas para la síntesis de lípidos (Granlund *et al.*, 2005), aunque se desconoce el efecto de CLA sobre la calidad y número de blastómeras en embriones bovinos PIV.

3. *Índice de apoptosis de embriones bovinos producidos in vitro*

Se sabe que el número de células que constituyen el embrión es un factor condicionante de su competencia y dicho número no depende únicamente del medio utilizado durante el cultivo, sino que está condicionado también por el ambiente (Block *et al.*, 2010).

Recientemente se ha publicado el efecto de compuestos de distinta naturaleza como la sericina, un antioxidante (Isobe *et al.*, 2012), polifenoles de té verde (Wang *et al.*, 2013), la ghrelina, péptido gástrico (Dovolou *et al.*, 2014) dexametasona, un potente glucocorticoide sintético (Santana *et al.*, 2014) o la melatonina (Wang *et al.*, 2014a), sobre la expresión de genes, número y calidad de los blastocistos bovinos PIV.

Los datos sobre la población celular de los embriones bovinos PIV son tan abundantes como publicaciones existen en el tema, debido a la multitud de condiciones experimentales existentes, y que tienen un efecto directo sobre este parámetro. Así, en medios químicamente definidos (PVA) la media del números de blastómeras es de 91 ± 5 (Keskintepe y Brackett, 1996), 70 ± 23 (Holm *et al.*, 1999), $74,8 \pm 4$ (Gandhi *et al.*, 2000) y

89 ± 4 (Orsi y Lesse, 2004), similares a los reportados en este trabajo ($83,4 \pm 7,6$). En cuanto a la suplementación con BSA, el promedio se ubica en $105,3 \pm 3,9$ (Orsi y Lesse, 2004), $124,7 \pm 4,9$ (Mucci *et al.*, 2006), $154 \pm 8,8$ (Trigal *et al.*, 2011), $131,6 \pm 4,1$ (Sudano *et al.*, 2011) y $126,3 \pm 3,4$ (Wang *et al.*, 2013), mientras que la media para el trabajo que aquí se presenta, y el grupo de PVA fue de $99,5 \pm 4,5$, valor por debajo de los publicados por autores anteriormente mencionados.

Gardner *et al.* (1994), Byrne *et al.* (1999), Fouladi-Nashta *et al.* (2005) y Sudano *et al.* (2008), señalan que los medios de cultivo con suero aumenta el número de blastómeras en los embriones PIV, existiendo una relación entre la cantidad de suero y el número de blastómeras. En el trabajo de Sudano *et al.* (2011; 2012a), a medida que aumenta la concentración de FCS, también lo hace el número de blastómeras y el índice de apoptosis.

Durante el desarrollo temprano la apoptosis es un mecanismo importante para el mantenimiento del número adecuado de células funcionales y sanas (Neuber *et al.* (2002) y Fabian *et al.* (2005a); sin embargo, existen umbrales máximos y mínimos para la presentación de apoptosis asegurando la homeostasis del embrión. Fabian *et al.* (2005), aseguran que si el índice de apoptosis es elevado, la presencia masiva de células muertas podrían alterar su equilibrio y consecuentemente detener su desarrollo y morir. El aumento de la apoptosis es un indicador importante del ambiente inadecuado para el embrión.

Los métodos de detección de la apoptosis no dan resultados muy precisos. Aunque el ensayo de TUNEL es el método más utilizado que permite la detección *in situ* de células apoptóticas por la degradación del DNA, su especificidad es relativamente baja, ya que los núcleos de las células que experimentan necrosis también son detectadas (Manjo y Joris, 1995; Darzynkiewicz *et al.*, 2001; Gjørret *et al.*, 2003).

Los núcleos condensados podrían confundirse fácilmente con cuerpos polares; en el caso de núcleos fragmentados dispersos o cuerpos apoptóticos, el número de células originales podría ser estimada de forma incorrecta. La mejor manera de obtener resultados adecuados, por tanto, es la combinación de varios métodos de detección de la apoptosis y clasificar

como apoptóticas sólo las células que muestran tanto morfología y características bioquímicas de la apoptosis (Yang y Rajamahendran, 2002).

Algunos de los documentos mencionados informan tal combinación (Trigal *et al.*, 2011), pero generalmente no lo hacen (Fabian *et al.*, 2005). Gjørret *et al.*, 2003, resuelven tal discrepancia clasificando como núcleos apoptóticos aquellos que muestran bordes bien definidos, mientras que los necróticos son difusos y le dan el nombre de plumosos. Obviamente, esto se puede lograr con el empleo de un microscopio confocal.

La frecuencia de la apoptosis en los blastocistos varía ampliamente en las especies (Matwee *et al.*, 2000). La supervivencia de los embriones mamíferos preimplantacionales no dependen solamente de las condiciones idóneas para su desarrollo normal sino también de los adquisición de mecanismos por los cuales los embriones enfrentan la adversidad (Betts y King, 2001). El grado y regulación de la muerte celular durante el desarrollo preimplantacional es probable que sea crítico para el desarrollo de estadios que van más allá del estadio de blastocisto (Brison y Schultz, 1997).

El porcentaje de embriones que mostraron al menos una señal de apoptosis fue reportado entre el 91 y 100% de los blastocistos bovinos producidos tanto *in vivo* como *in vitro*, respectivamente (Byrne *et al.*, 1999; Gjørret *et al.*, 2003) y 100% en los blastocistos humanos PIV (Hardy, 1999).

En este trabajo, la proporción de células positivas a la tinción de TUNEL para los blastocistos cultivados en presencia de PVA fue de $8,0 \pm 1,9\%$ y en BSA de $7,5 \pm 1,2\%$, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas. Esta última más baja que la reportada por Pomar *et al.* (2005), Sudano *et al.* (2011), (Plourde *et al.*, 2012a) y Wang *et al.* (2013) con $10,3 \pm 10,9\%$; $13,8 \pm 1,2\%$; $17 \pm 8\%$ y $9,3 \pm 0,9\%$, respectivamente, pero más alta que la publicada por Trigal *et al.* (2011) con un $3,9 \pm 1,4\%$ núcleos apoptóticos.

Se ha demostrado que la incidencia de apoptosis en los embriones puede verse afectada de manera significativa por la edad de la donadora de ovocitos, las condiciones de la

fecundación (Jurisicova *et al.*, 1998) y la composición del medio de cultivo en el caso de la producción *in vitro* (Pampfer, 2000; Kamjoo *et al.*, 2002; Cui *et al.*, 2004; Ghanem *et al.*, 2014). Así, al incluir el FCS al 1%, el índice de apoptosis aumentó hasta un $10,4 \pm 2,9\%$, y con el FCS al 5% de FCS, el índice de apoptosis fue de $9,2 \pm 2,4\%$, sin mostrar diferencias significativas; estos datos son similares a los observados por Van Soom *et al.* (2002) ($10,7 \pm 1\%$) y Yuan *et al.* (2003) ($10 \pm 1\%$); pero inferiores al reportado por Sudano *et al.* (2012) (20%).

Estos resultados confirman, uno de los efectos negativos que ha sido atribuido al uso de suero en los medios de cultivo, como es el aumento del células apoptóticas (Byrne *et al.*, 1999; Cui *et al.*, 2004; Sudano *et al.*, 2011). El FCS adicionado al medio de cultivo, es abundante en factor de crecimiento derivado de plaquetas (siglas en Inglés, PDGF) y factor de crecimiento transformante α (siglas en Inglés, TGF- α) (Gardner y Lane, 2014).

Contiene además una cantidad desconocida de otros factores de crecimiento de naturaleza peptídica denominados *salvavidas*, como el IGF-I, que reducen la incidencia de apoptosis (Makarevich y Makkula, 2002; Jousan y Hansen, 2004) pero también están presentes factores *mortales*, tal como el factor de necrosis tumoral (siglas en Inglés, TNF) que podría desencadenar la muerte celular (Byrne *et al.*, 1999) induciendo la apoptosis y la fragmentación de ácidos nucleicos (Betts y King, 2001).

Los estudios realizados por De Vries *et al.* (1997), han permitido conocer que los ácidos grasos no metabolizados son capaces de inducir apoptosis y que su incidencia se encuentra relacionada con la presencia de ácidos grasos libres de cadena larga, más allá de los ácidos grasos libres insaturados. Se sugiere que este evento podría estar relacionado con la condición de precursor de factores pro-apoptóticos de los ácidos grasos saturados como las ceramidas, así como con la baja eficiencia de este tipo de ácidos grasos para la biosíntesis de cardiolipina, un lípido de la membrana mitocondrial interna (Ostrander *et al.*, 2001).

Además se ha observado que los ácidos grasos no esterificados pueden actuar directamente sobre la mitocondria e inducir un incremento en la permeabilidad de la membrana

mitocondrial, con lo que produce la liberación del citocromo C y tiene lugar la apoptosis (Socorrano *et al.*, 2001). En cuanto a las condiciones ambientales, Ho *et al.* (1994), afirman que la alta tensión de oxígeno en sistemas de cultivo *in vitro* retrasa el desarrollo embrionario y puede llegar a ser especie-específica. Experimentos conducidos con alta tensión de oxígeno se ve incrementada la aparición de ROS (Yang *et al.*, 1998), aparentemente involucrados en el retraso del desarrollo de embriones producidos *in vitro* (Noda *et al.*, 1991). Los radicales libres pueden causar roturas en la cadena de DNA y otras formas de daño celular como la peroxidación lipídica que ocasionan arresto en el ciclo celular o la muerte.

En varias especies animales, la apoptosis se observó por primera vez durante la formación del blastocisto y ocurre predominantemente en las células de la MCI (Jurisicova *et al.*, 1995), que conservan el potencial de formar el TE. A través de este mecanismo se reduciría el riesgo de la inapropiada expresión ectópica de la diferenciación de capas germinales (Piecrce *et al.*, 1989).

Por otra parte, la apoptosis en los embriones podría ser una medida para eliminar células anormales, dañadas y células con un potencial de desarrollo comprometido (Hardy, 1999), lo que supondría un mecanismo regulador interno cuyo último fin sería mejorar la calidad embrionaria (Betts y King, 2001). La apoptosis también podría ser el resultado de la exposición física y tóxica, efectos de la citoquinesis e infecciones virales (Brison y Schultz, 1997).

Los índices de células apoptóticas por blastocisto, varía entre 1,4 a 10,25% en blastocistos de ratón producidos *in vivo* e *in vitro* (Liu *et al.*, 2002), de 0 a 7,3% en blastocistos de cerdos producidos *in vivo* e *in vitro* (Pomar *et al.*, 2004), de 7 a 10% en blastocistos humanos producidos *in vitro* (Hardy, 1999), y de 4 a 9% en blastocistos bovinos producidos *in vitro* (Gjørret *et al.*, 2003).

No obstante, estos datos no se pueden tomar como definitivos para estimar la incidencia normal de apoptosis para cada especie. Investigaciones anteriores revelaron que la alta

incidencia de apoptosis en blastocistos de mamíferos está influida por varios factores (Fabian *et al.*, 2005). La edad del embrión evaluado no siempre es la misma, generalmente va desde 6,5 a 9,5 d en el bovino. Por lo general, los blastocistos son evaluados sin ser separados, y la incidencia de apoptosis es variable en blastocistos, blastocistos expandidos y eclosionados. El aumento de los números de núcleos apoptóticos se detectó en blastocistos expandidos y los niveles más bajos en los blastocistos tempranos, justo antes de la transferencia (Handyside y Hunter, 1986).

Con el objetivo de disminuir la incidencia de apoptosis. Walters *et al.* (2005), plantean la evaluación morfológica del espermatozoide que va destinado a la prácticas de FIV debido a la influencia paterna sobre la calidad del embrión. Por su parte, Gualtieri *et al.* (2014), propone la suplementación de los medios para el tratamiento de espermatozoides con dos antioxidantes (zinc y la coenzima Q10) y D-Asp, promueven la calidad embrionaria disminuyendo el número de células apoptóticas.

En el trabajo realizado por Wang *et al.* (2013), se observa que el cultivo con polifenoles de té verde (siglas en Inglés, GTP) a 15 μM , disminuyó la cantidad de núcleos apoptóticos. El mecanismo de reducción por parte de GTP del número de células apoptóticas no está del todo claro. Se cree que la concentración de 15 μM induce la abundancia de transcritos de tres genes antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX).

Los resultados publicados por Kuwamura *et al.* (2007), demuestran que en embriones de ratón PIV, la inducción de apoptosis por parte TNF, es inhibida en presencia de TGF- α . La incorporación de PES y LC, dos agentes reductores del contenido lipídico, disminuyó el número de células TUNEL-positivas (Ghanem *et al.*, 2014). Seidel (2006) y Barceló-Fimbres y Seidel (2007a), señalan que las mejoras en la calidad del embrión se atribuyeron a la reducción de contenido de lípidos citoplasmáticos, lo que podría haber disminuido la peroxidación lipídica, reduciendo de este modo la producción de radicales libres dentro del embrión.

4. *Ultraestructura de blastocistos bovinos producidos in vitro*

Las investigaciones que se llevan a cabo con el objetivo de evaluar el efecto de un sistema o las condiciones de cultivo sobre el desarrollo del embrión preimplantacional tienen mayor impacto o si se analiza la calidad embrionaria mediante estudios de MET. Estos análisis se realizan con el propósito de evidenciar cambios morfológicos a nivel citoplasmático y nuclear que permiten comprobar la calidad embrionaria y posteriores cambios o la respuesta del embrión bajo condiciones ambientales subóptimas.

Los cortes histológicos y ultraestructurales en blastocistos bovinos frescos observados en este estudio, son consistentes con los reportados previamente en cultivos de embriones con y sin suero (Ohboshi *et al.*, 1998; Abe *et al.*, 1999; 1999a; 2002; Aguilar *et al.*, 2002; Rizos *et al.*, 2002). Además, la ultraestructura observada de blastocistos frescos también fue similar a los hallazgos presentes en otras especies (ovejas: Cocero *et al.*, 2002; Bettencourt *et al.*, 2009; cerdos: Cuello *et al.*, 2007), en la misma etapa de desarrollo.

Entre las características más notorias en los blastocistos bovinos PIV, destaca el aumento en el contenido de gotas lipídicas en el citoplasma (Thompson, 1996; Abe *et al.*, 1999; Crosier *et al.*, 2000, 2001), la apariencia de las mitocondrias se caracteriza por una matriz electrodensa, lo que podría tener implicaciones en la respiración celular (Rizos *et al.*, 2002) y la presencia de MV en el EP, junto con las uniones estrechas entre las células del TE y la MCI (Mohr y Trounson, 1982; Vajta *et al.*, 1997; Ohboshi *et al.*, 1998; Fair *et al.*, 2001; Fabian *et al.*, 2005a; Cuello *et al.*, 2007). En general, los cortes semifinos y ultrafinos, demuestran que los embriones bovinos cultivados en presencia de FCS (1% y 5%), acumularon una cantidad anormal de gotas lipídicas, coincidiendo con lo reportado por Abe *et al.* (2002).

En la reciente publicación de Gardner y Lane (2014), “Cultivo *in vitro* viable de embriones mamíferos”, se manifiesta que la inclusión de suero en los sistemas de cultivo de embriones, ya no se puede considerar aceptable. Es importante destacar que los embriones de mamíferos no están expuestos a suero en condiciones *in vivo*. Más bien, es un fluido

patológico. A pesar de esto, la adición de suero al medio de cultivo le confiere cierto grado de protección al embrión, por su capacidad para reducir al mínimo los cambios de pH y neutralizar potenciales toxinas. Es por esta capacidad de proporcionar robustez al medio de cultivo que su uso ha persistido.

Actualmente existen en el mercado compuestos formulados con el fin de reemplazar el FCS en los medios de cultivo. Entre estos el SR[®] (siglas en Inglés, *Serum Replacer*; Invitrogen), Utraser G[®] (Invitrogen), CPSR-3[®] (siglas en Inglés, *Controlled Process Serum Replacement*, SIGMA), que se obtiene del dializado del plasma bovino. Duque *et al.* (2003), demostraron que es posible producir embriones *in vitro* utilizando estos compuestos aunque observaron que el reemplazo del suero por Ultroser[®] disminuyó significativamente la PIV de embriones bovinos, mientras que utilizando CPSR-3[®] no obtuvieron diferencias en esta variable ni tampoco en el número total de células. Moore *et al.* (2007), confirman que el uso del SR[®] (sustituto comercial de FCS) mejoró la PIV, criotolerancia de embriones bovinos.

La presencia de FCS, en los medios de cultivo para embriones bovinos, aumenta la cantidad de gotas lipídicas pequeñas (1%, desde día 1 al 8), medianas y grandes (5%, desde el día 6 al 8) en el citoplasma del embrión, lo igual que el número de blastómeras totales y apoptóticas. El sistema de PIV de embriones bovinos mestizos empleado en el presente trabajo muestra resultados que hablan de lo adecuado del mismo. Sin embargo, y a pesar de la adición de PVA y BSA, como sustitutos del FCS, este sistema de producción PIV debe seguir perfeccionándose hasta alcanzar tasas de blastocistos superiores de manera estable, y con éxito en la práctica de criopreservación.

5. Vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro*

La vitrificación sigue siendo el método de elección para la criopreservación de los embriones PIV, puesto que es un método simple, no requiere equipamiento de congelación controlada y tiene buenos resultados de supervivencia (Morató *et al.*, 2010, 2014). Adicionalmente, el uso del contenedor *fibreplug* ofrece dos grandes ventajas, aumenta la

tasa de enfriamiento (volumen mínimo de la solución vitrificadora donde están contenidos los embriones) y el control del riesgo de contaminación vía N₂L. En el presente estudio, las tasas de recuperación de embriones bovinos mestizos tras la vitrificación fue de 94,39%, similar a lo reportado por Ghanem *et al.* (2014), usando microgotas (95,83%) y Ha *et al.* (2014), empleando pajuelas de 0,25 mL (90,58%).

5.1. Supervivencia embrionaria después de la vitrificación

La tasa de re-expansión de los blastocistos obtenida en este trabajo, con valores superiores al 40%, apoya la efectividad del método de vitrificación con *fibreplug*. Trigal *et al.* (2012), fueron los primeros en confirmar que, en bovinos, los contenedores *fibreplug*, permiten obtener altas tasas de supervivencia y embriones morfológicamente normales, además permitir la obtención de un 34,61% de terneros nacidos de un total de 26 embriones transferidos.

Los resultados de supervivencia *in vitro* de los EPIV tras vitrificación/calentamiento presentan una elevada heterogeneidad. Aunque varios autores presentan datos que oscilan entre el 70% y el 80% (Gómez *et al.*, 2008; Shirazi *et al.*, 2009; Siqueira *et al.*, 2011), otros grupos citan resultados menos optimistas reportando un 35% de supervivencia a las 72 h post-calentamiento (Yu *et al.*, 2010). En este trabajo, los datos de re-expansión a las 2, 24 y 48 h, fueron ligeramente superiores en el grupo mSOFaaci + PVA, que en los mSOFaaci + BSA. Pereira *et al.* (2007), quienes también utilizaron medios químicamente definidos (PVA), obtuvieron un 49% de blastocistos re-expandidos.

A su vez, Shizari *et al.* (2009), empleando 6 mg/mL de BSA en el medio SOFaa para el cultivo de embriones, obtuvieron tasas de re-expansión tras la vitrificación inferiores a las reportadas en este trabajo, igualmente la ausencia de eclosionados para medios medianamente definidos. Lane *et al.* (2003), reportan que los embriones bovinos cultivados en albúmina humana recombinante muestran una mayor tasa de re-expansión y de eclosión, comparada con los cultivados en presencia de BSA. Lane *et al.* (2003), Block *et al.* (2009) y Plourde *et al.* (2012a), señalan que existen ciertas moléculas, en algunos lotes

comerciales de BSA, que pueden reducir la supervivencia de los blastocistos bovinos después de la vitrificación.

Coincidiendo con lo reportado por Abdalla *et al.* (2010), en este trabajo, las mayores tasas de supervivencia se observaron en los grupos de blastocistos expandidos a las 24 y 48 h del calentamiento. La relación entre el tamaño del blastocisto y su criotolerancia han sido tema de investigación. Mientras el blastocisto aumenta en tamaño, mejora su respuesta a la criopreservación, al compararlo con blastocistos de menor tamaño y similar edad (Keskintepe y Brackett, 2000; George *et al.*, 2008; Morató *et al.*, 2010).

A pesar de que en este trabajo no se encontraron diferencias significativas entre la edad y estadio embrionarios, con relación a la supervivencia post-vitrificación, Saha *et al.* (1996), afirman que la edad de los embriones puede influir sobre sus características criobiológicas. Los blastocistos bovinos derivados de la FIV que aparecen hasta 7 d de cultivo se consideran más viables y capaces de sobrevivir a la criopreservación que los que alcanzan este estadio a los ocho o nueve días (Mahmoudzadeh *et al.*, 1995; Morató *et al.*, 2010), considerándose estos últimos blastocistos retrasados o poco viables (Dinnyés *et al.*, 1999).

Es posible que la alta tasa de supervivencia de los blastocistos y blastocistos expandidos de 7 d, sea porque son embriones más vigorosos (Han *et al.*, 1994). Asimismo, entre los blastocistos que se desarrollan el mismo día, los embriones que llegan a expandirse o alcanzar un mayor diámetro más precozmente son más criotolerantes (Mucci *et al.*, 2006).

La tasa de supervivencia encontrada en este estudio para blastocistos de 7 d de cultivo empleando los contenedores *fibreplug* fue mayor a la encontrada usando pajuelas de 0,25 mL (38%; Mahmoudzadeh *et al.*, 1995). Mientras que para los blastocistos expandidos del mismo día de cultivo (día 7), el resultado fue inferior a los observados en otros trabajos, 86% (Abdalla *et al.* 2010) y 94% (Kelly *et al.*, 2004) empleando los *cryotop* y un 89% para las OPS (Vajta *et al.*, 1999). Mientras que para blastocistos expandidos de 8 d, los resultados se encuentran en un 90% de supervivencia empleando las OPS (Dinnyés *et al.*, 1999).

En general, la re-expansión de los blastocistos bovinos tras la vitrificación parece tener el mismo comportamiento: a las primeras h del calentamiento mostrando las mayores tasas y transcurridas 24 h o más, comienzan a declinar alcanzando las menores tasas a las 48 ó 72 h. Esta característica coincide con lo reportado en los trabajos de Rizos *et al.* (2002; 2003), Nedambale *et al.* (2004), George *et al.* (2006), Lim *et al.* (2008), Hochi *et al.* (2010), Stinshoff *et al.* (2011), Ha *et al.* (2014) y Ghanem *et al.* (2014).

La explicación del descenso del número de re-expandidos pareciera ser consecuencia más de características propias de los embriones PIV y estar relacionado con la alteraciones en la organización del citoesqueleto, la depolimerización por parte de los agentes crioprotectores o daño ocasionado por la criopreservación *per se* (Dobrinsky, 1996), lo que se traduce en una mayor sensibilidad a la criopreservación y un detrimento en su competencia para el posterior desarrollo (Serrano *et al.*, 2002). También puede ser debido a que el medio de desarrollo le proporciona condiciones subóptimas a las que no son capaces de adaptarse.

La membrana plasmática es la primera estructura que sufre daños como consecuencia de una exposición a bajas temperaturas, siendo la primera consecuencia la disminución de su integridad y la consecuente muerte celular (Horvath y Seidel, 2006). El grado del daño va a depender de las propiedades bioquímicas y biofísicas de la misma, así como la intensidad de la baja temperatura y su duración. El daño causado en la membrana plasmática por la congelación se debe a la fase de transición de la membrana lipídica que altera su estructura y función (Zeron *et al.*, 2002), la cantidad (Arav *et al.*, 1996) y la naturaleza de la molécula lipídica que la constituye (Carro *et al.*, 2013).

Sudano *et al.* (2012), mediante espectrometría de ionización de masas, determinaron que blastocistos *B. taurus taurus* PIV presentan mayor contenido lipídico que los producidos *in vivo* y que blastocistos *B. taurus indicus*. Sin embargo, la caracterización de los lípidos presentes demostró que embriones producidos *in vivo* contienen preferentemente ácido oléico (18:1) y ácido linoléico (18:2), mientras que embriones PIV contienen en su mayoría ácido palmítico (16:0) y ácido esteárico (18:0). Las especies de lípidos variaron de acuerdo al genotipo, observándose que embriones *B. taurus taurus* contienen predominantemente

ácido linoléico (18:2), mientras que embriones *B. taurus indicus* contienen mayormente ácido palmítico (16:0) y ácido esteárico (18:0), lo que podría explicar la mayor sensibilidad al proceso de criopreservación en embriones cebuínos.

Esta observación coincide con lo reportado por Visintin *et al.* (2002), quienes afirman que los embriones *B. indicus* PIV contiene mayor contenido de lípidos, lo que los hace más sensibles a los procesos de criopreservación que los *B. taurus*. De esta forma cobra cada vez más importancia no sólo la cantidad de lípidos almacenados en el citoplasma y la membrana celular, sino las especies lipídicas que las constituyen (Sudano *et al.*, 2012).

Los TAG son los lípidos más abundantes en los embriones (Díez *et al.*, 2001), y la degradación de los lípidos puede ser inducida por varios agentes como forskolina. Este agente actúa en la vía de señalización lipolítica, activando la adenilciclase, aumentando los niveles de AMP_c y activando las lipasas (Londos *et al.*, 1999). En el reciente trabajo de Sanches *et al.* (2013), concluyeron que la adición de forskolina (10 mM, por 48 h) durante el CIV, mejora la criotolerancia, aumentando las tasas de preñez después de transferencia de blastocistos *B. indicus* PIV.

Además de lo anteriormente expuesto, y desde el punto de vista práctico, la probabilidad de éxito de la vitrificación depende principalmente de tres factores: viscosidad de la muestra, tasa de enfriamiento/calentamiento y volumen de la muestra. Uno de los problemas más comunes asociados con la vitrificación, es la alta concentración de los crioprotectores penetrantes y no penetrantes, y sumado a esto, el tiempo y la temperatura de exposición, que pueden provocar el daño de la célula a través de un efecto tóxico o choque osmótico (Rall y Fahy, 1985; Yavin y Arav, 2007).

Existen trabajos que confirman que la adición de sacarosa a bajas concentraciones (0,1 y 0,3 M) tiene un efecto positivo sobre la supervivencia embrionaria, mientras que a altas concentraciones (0,5 M) produce una disminución en las tasas de eclosión (Leibo *et al.*, 1996; Széll *et al.*, 1989; Somgsasen *et al.*, 2002). Por su parte, Martínez *et al.* (2002),

afirman que el uso de altas concentraciones de glucosa provoca un choque osmótico, con el que se conduce a un desequilibrio en la salida de solutos.

En cuanto a los efectos de los crioprotectores penetrantes, los de uso más frecuente para la criopreservación de embriones mamíferos son el glicerol, EG, DMSO y propilenglicol. El mecanismo de protección de estos agentes permeables es considerado el mismo, pero su toxicidad es diferente. En la vitrificación, la concentración de los crioprotectores puede ser superior a los 8 M por lo que la selección de un agente con baja toxicidad es muy importante. El EG y glicerol son considerados menos tóxicos que el propilenglicol y DMSO (Mukaida y Kasai, 2004). Estudios previos han demostrado que los blastocistos bovinos son altamente permeables al EG, por lo que su difusión es facilitada a través del canal de agua aquaporina3, mientras que el DMSO lo hace mediante difusión pasiva (Széll *et al.*, 1989; Jin *et al.*, 2011).

En la revisión realizada por Bielanski (2012), revela que los crioprotectores más exitosos para la criopreservación de microorganismos son el DMSO, metanol, propilenglicol y EG, y los menos eficaces son el glicerol y polietilenglicol. A concentraciones de 5% el DMSO, puede proteger a los virus del trauma ocasionado por la criopreservación. En cuanto a las bacterias, muchos de estos microorganismos toleran altas concentraciones de DMSO sin efectos tóxicos visibles y algunas (*Acinetobacter spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Bacillus spp.*, y *Streptomyces spp.*) son capaces de multiplicarse en medios que contengan entre 2 y 45% de DMSO. Por ello el uso de este crioprotector para el criopreservamiento de embriones es considerado riesgoso mientras que el más recomendable es el glicerol junto con el EG.

Los protocolos empleados por Geroge *et al.* (2006), Lim *et al.* (2008), Kim *et al.* (2012), Yang *et al.* (2012), Ghanem *et al.* (2014) y Ha *et al.* (2014a), fueron beneficiosos para la vitrificación de blastocistos bovinos PIV, en ausencia de DMSO y en una mezcla de EG + FCS + sacarosa. Jin *et al.* (2011), confirmaron que el EG difunde a través del blastocisto a una velocidad de 108,5 μ /min a 25 °C; lo que Kim *et al.* (2012) consideraron un dato importante para simplificar la exposición de este crioprotector a un solo paso, suficiente

para evitar la formación de hielo intracelular en las células del TE y MCI aunque no se puede descartar la posibilidad de la formación de hielo en el BC, lo que inevitablemente desencadenaría una serie de eventos relacionados con la destrucción de la MP y la muerte celular.

Se están desarrollando diferentes estrategias para mejorar los resultados de la criopreservación. Matsumura e Hyon (2009), proponen el uso de la ϵ -poli-L-lisina carboxilada (PLL-COOH) como un CPA novedoso, ya que reduce los riesgos de daño por la recristalización de hielo durante la congelación y calentamiento. Los estudios conducidos por Shibao *et al.* (2014), sugieren la posibilidad de que la PLL-COOH es el CPA más adecuado en la criopreservación de embriones de ratón, que otros CPA que se han utilizado hasta la fecha. Estos investigadores atribuyen este aporte por su actividad similar a las proteínas anticongelantes.

Existen otras estrategias que incluyen la reducción de los volúmenes de los contenedores, el incremento del gradiente térmico, los cambios en la relación superficie/volumen, el mejoramiento de la criotolerancia mediante la suplementación con varios aditivos (Gutnisky *et al.*, 2013; Morató y Mogas, 2014; Salzano *et al.*, 2014), o modificando la composición lípido-lípido de la membrana ovocitaria (Jiménez-Trigos *et al.*, 2013), con el propósito de aumentar la fluidez de la membrana y la permeabilidad a bajas temperaturas. Para lograr esto, el colesterol puede ser añadido a la membrana plasmática, proporcionando de este modo un método alternativo para aumentar tolerancia ante la criopreservación (Horvath y Seidel, 2006).

5.2. *Apoptosis*

Varios autores han utilizado la técnica de TUNEL para estudiar los efectos de la vitrificación en embriones bovinos PIV (Pomar *et al.*, 2005; George *et al.*, 2006; Hochi *et al.*, 2010; Sudano *et al.*, 2011, 2012; Ha *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2013; Morató *et al.*, 2010; Morató y Mogas, 2014).

En este trabajo, el grupo los blastocistos de ambos sistemas de cultivo (PVA y BSA), mostraron una proporción ligeramente superior de blastómeras alteradas, a las 2 h de calentamiento, al compararla con los blastocistos expandidos ($P > 0,05$). Estos resultados son superiores a los reportados por Morató *et al.* (2010), con 6% y 2%, de índice de apoptosis, valorado a las 3 h de calentamiento, para blastocistos y blastocistos expandidos, respectivamente.

AbdelHafez *et al.* (2011), atribuyen el amplio rango de daño al DNA producido en los blastocistos vitrificados, a las diferencias de contracción del BC justo después de la exposición a las soluciones vitrificadoras. Además afirman que esta respuesta, ante las soluciones vitrificadoras, puede variar en blastocistos incluso del mismo estadio y edad de cultivo. La solución podría estar en inducir la contracción artificial o el colapso de los blastocistos antes de la vitrificación, lo que reduce el daño al DNA y aumenta las tasas de re-expansión y reduce el número de células alteradas en blastocistos después de la vitrificación. La razón de esta práctica es porque ayuda a prevenir el daño de cristales de hielo mediante la reducción de fluido dentro de la cavidad del BC (Desai *et al.*, 2008; Hur *et al.*, 2011).

Dobrinsky (1996), Brison y Schultz, (1997), manifiestan que la disminución del número de blastómeras viables consecuentes al aumento de células apoptóticas está relacionado con la reducción de la calidad embrionaria en blastocistos criopreservados; al igual que los bajos niveles de expresión de los genes anti-apoptóticos (Bcl-2 y Mcl-1) o antioxidantes (MnSOD o peroxiredoxin 5) (Ha *et al.*, 2014a). La criopreservación puede potenciar estas últimas características e incluso aumentar los niveles de ROS.

El estrés oxidativo puede propiciar a su vez, la apoptosis en los embriones (Feugang *et al.*, 2003). Gómez *et al.* (2009), afirman que la MCI muestra una mayor tasa de apoptosis que las células del TE en blastocistos de mamíferos. Esto sugiere que la apoptosis ocurre normalmente para eliminar las células de la MCI comprometidas, por lo que la MCI sufre un control más estricto que en el TE (Baguisi *et al.*, 1999).

Como la cascada de apoptosis puede ser activada en embriones bovinos en respuesta a la vitrificación (Park *et al.*, 2006), la presencia de más actividad apoptótica en la MCI puede ocasionar la muerte y desaparición de este grupo de células en embriones vitrificados (Gómez *et al.*, 2009). El marcado descenso del número de células del TE en blastocistos vitrificados/calentados podría ser una consecuencia del retraso de la proliferación celular embrionaria después de la criopreservación (Takagi *et al.*, 1996).

5.3. *Presencia del EGF post-calentamiento*

En este trabajo, la incorporación del EGF al medio de cultivo de los blastocistos vitrificados/calentados no produjo ningún efecto sobre la calidad embrionaria, ni tampoco mejoró la criotolerancia de los blastocistos bovinos PIV. El índice de apoptosis en los blastocistos, 24 h después del calentamiento, en presencia o no del EGF, estuvo alrededor del 45%. Este porcentaje fue similar al reportado por Sudano *et al.* (2011) a las 12 h después de la vitrificación ($37,3 \pm 2,6\%$); pero difirió de lo publicado por Ha *et al.* (2014) ($10,9 \pm 9,6\%$) y Ha *et al.* (2014a) ($9,4 \pm 14,7\%$) a las 24 h de calentamiento y de lo reportado por George *et al.* (2006) ($7 \pm 0,9\%$) a las 48 h.

Aún así, al EGF se le atribuyen varios efectos beneficiosos. En el ratón, por ejemplo, induce cambios favorables durante el desarrollo embrionario como es la formación del blastocisto, expansión y eclosión (Adamson, 1993). En el trabajo de Wei *et al.* (2001), produciendo embriones porcinos *in vivo* e *in vitro*, afirman que sólo es posible obtener los efectos estimulantes del EGF si está en presencia de una reducida cantidad de BSA (0,1%).

Por ello se hace necesario más estudios sobre el potencial sinérgico entre el EGF y BSA en el CIV. En el trabajo de Block *et al.* (2009), las mayores tasas de re-expansión y eclosión después de la vitrificación en blastocistos bovinos se obtuvo en presencia de ácido hialurónico (1,0 mg/mL); mientras que en presencia de ácido hialurónico y BSA (4 mg/mL) provoca un ligero descenso en ambas tasas.

Makarevich *et al.* (2011), evaluaron el efecto del IGF-I después de la vitrificación en blastocistos bovinos producidos *in vivo*, observando un mayor número de blastómeras y filamentos de actina intactos (grado I) junto con un menor índice de apoptosis. Estos autores afirman que el IGF-I tiene un efecto regenerador sobre los filamentos de actina que sufrieron cambios reversibles durante la criopreservación.

En el trabajo de Jousan y Hansen (2004), el IGF-I bloquea los efectos del choque térmico sobre el desarrollo embrionario y evita la inducción de la apoptosis en respuesta a la elevada temperatura. Block *et al.* (2008), señalan que el efecto de este factor de crecimiento no está relacionado directamente con el aumento del número de blastómeras o disminución del daño en la fragmentación del DNA, sino más bien a la expresión de varios genes importantes para el desarrollo y supervivencia embrionaria.

Más tarde, Hochi *et al.* (2010), reportaron que la presencia del inhibidor (Y-27632) de la cinasa en espiral asociada a Rho (siglas en Inglés, ROCK), durante el período post-calentamiento, mejoró notablemente la supervivencia de los blastocistos bovinos PIV. Esto quizás se debe a que el inhibidor de ROCK (Y-27632) estimula en humanos la recuperación y crecimiento de células madre embrionarias congeladas/descongeladas y juega un papel crítico en la inhibición de la apoptosis. Entre las moléculas que pueden mejorar las condiciones post-cultivo están el IGF-I, el factor estimulante de colonias 2 (siglas en Inglés, CSF-2) y el ácido hialurónico.

Aunque los mecanismos que conducen a un mejoramiento en la supervivencia embrionaria por parte de estas moléculas no están del todo claros, su adición en los medios de cultivo conduce al aumento en la proporción de blastocistos, un mayor número de células de la MCI y disminución del número de células apoptóticas. Por lo tanto, puede ser posible mejorar la supervivencia embrionaria en las últimas etapas de cultivo e incluso después de la transferencia mediante el uso individual o combinado de estas moléculas (Block *et al.*, 2011).

La definición de un sistema de cultivo adecuado se ha complicado dada la multiplicidad de las condiciones de cultivo y el hecho de que los mismos embriones tienen diferentes capacidades para lograr completar su desarrollo en un sistema de cultivo en particular. No hay duda de que los sistemas de cultivo embrionario afectan la calidad embrionaria, por lo que hasta el momento, no hay suficiente información para concluir cuál es el "mejor" de los medios o sistemas de cultivo, aunque es evidente que hoy en día, la mayoría de los medios definidos o semidefinidos (en un sistema estático o secuencial) producen embriones de buena calidad (es decir, morfología y criotolerancia). Sin embargo, los embriones morfológicamente normales, no garantizan plenamente un mejor éxito durante el desarrollo después de la TE (Khosla *et al.*, 2001).

5.4. Evaluación ultraestructural de blastocistos bovinos después de la vitrificación

Las valoraciones de los cortes semifinos (700 nm) proporcionan información importante acerca de los embriones degenerados, clasificados en esta categoría desde la observación en el microscopio estereoscópico. Muestran desorganización y desintegración celular como ha sido reportado por Ohboshi *et al.* (1998). El análisis ultraestructural de embriones criopreservados-calentados es limitado para los blastocistos bovinos que han sido vitrificados (Vajta *et al.*, 1997; Ohboshi *et al.*, 1998 Rizo *et al.*, 2002). En este estudio se describen las características ultraestructurales y los daños inducidos por la criopreservación en blastocistos bovinos vitrificados y calentados en contenedores *fibreplug*.

Independientemente del sistema de cultivo (PVA y BSA), estadio y edad de desarrollo, tanto los embriones que re-expandieron como los considerados no viables (en función de su aspecto morfológico), mostraron varios tipos de degeneraciones celulares, entre ellas, la pérdida de las microvellosidades, inestabilidad de la membrana plasmática, abundantes restos celulares, severos daños en las mitocondrias, abundante número de vacuolas, desorganización del citoesqueleto, que confirman los resultados de trabajos anteriores en embriones criopreservados de las especies ovina (Cocero *et al.*, 2002; Bettencourt *et al.*, 2009), porcina (Fabian *et al.*, 2005a; Cuello *et al.*, 2007) y bovina (Vajta *et al.*, 1997).

A pesar de la ausencia de estudios que comparen específicamente la ultraestructura de blastocistos criopreservados por congelación lenta contra la vitrificación, lesiones celulares similares fueron descritas en bovinos, ovinos y porcinos para embriones criopreservados por ambos métodos (Vajta *et al.*, 1997; Ohboshi *et al.*, 1998; Fair *et al.*, 2001; Cocero *et al.*, 2002; Cuello *et al.*, 2007; Bettencourt *et al.*, 2009).

Fabian *et al.* (2005), señalan que blastocistos porcinos PIV que fueron vitrificados experimentaron lesiones osmóticas, provocando el colapso del BC, lisis celular y parciales daños subcelulares. Vajta *et al.* (1997), apuntan a que la desintegración de las uniones estrechas entre las células adyacentes del TE conduce al colapso del BC. Estas alteraciones fueron similares a las observadas en blastocistos de 7 d PIV y vitrificados, tanto en ganado bovino (Fair *et al.*, 2001) como en ovino (Cocero *et al.*, 2002).

Los blastocistos bovinos muestran acumulación de residuos en el EP y dilatación de las mitocondrias. Sin embargo, el daño de las MV fue más evidente en blastocistos bovinos en comparación con los blastocistos porcinos. Las pequeñas diferencias probablemente fueron causadas por el uso de diferentes protocolos de criopreservación, pero también podría ser debido a la especificidad de cada especie estudiada (Fabian *et al.*, 2005).

La mayoría de las lesiones aquí descritas, podrían tener un impacto perjudicial sobre el citoesqueleto, lo que daría lugar a una grave desorganización a nivel celular como la que se observa en blastómeras degeneradas (Overstrom *et al.*, 1993). Johnson y Pickering (1987), señalan los efectos negativos de las bajas temperaturas y el uso de crioprotectores penetrantes durante la criopreservación de ovocitos y embriones mamíferos, en los que incluye la despolimerización del citoesqueleto por parte del DMSO. En el trabajo de van der Ven *et al.* (2007) se sugiere que el proceso de vitrificación/calentamiento, induce una alteración en las propiedades fisicoquímicas de los lípidos intracelulares.

Basado en esta hipótesis, existe una interacción compleja entre los lípidos intracelulares y los elementos del citoesqueleto por lo que el endurecimiento de estos lípidos podría causar la deformación y destrucción del citoesqueleto. Estos resultados también sugieren una

pérdida temprana de la estructura mitocondrial, lo que lleva a la interrupción del suministro de energía a las células. Las mitocondrias dañadas o alteradas después de la criopreservación han sido reportadas en estudios anteriores (Vajta *et al.*, 1997; Cocero *et al.*, 2002; Cuello *et al.*, 2007; Bettencourt *et al.*, 2009), lo que sugiere, que el nivel de conservación de la matriz mitocondrial, puede utilizarse como una señal fiable de daño celular (Bettencourt *et al.*, 2009).

En consecuencia, en las micrográficas donde se muestran graves lesiones mitocondriales, éstas se asocian con un mayor grado de daño celular, que van desde la dilatación de la matriz, pérdida de crestas, ruptura de membrana y finalmente la degeneración. Estos hallazgos vienen acompañados por un proceso degenerativo progresivo que involucra el aumento y aparición de vacuolas, seguido del aumento del nucleoplasma, pérdida de los poros nucleares y de la estructura nucleolar e interrupción de la envoltura nuclear (Bettencourt *et al.*, 2009).

El reporte realizado por Ohboshi *et al.* (1998), revela que los blastocistos bovinos valorados después de vitrificación, muestran daños a nivel celular producto de la criopreservación con pérdida de microvellosidades, deterioro de la membrana plasmática. Estos hallazgos indican que la vitrificación puede dañar las estructuras membranosas y provocar la desorganización extensiva de las blastómeras en embriones bovinos; el alcance y naturaleza de este daño es dependiente del proceso de vitrificación (Ohboshi *et al.*, 1998), en especial durante la etapa de calentamiento, por lo que pueden interferir negativamente en su rendimiento y posterior desarrollo embrionario (Otoi *et al.*, 1995, 1997).

Cada vez es más frecuente el uso de la técnica de microscopía inmuno-electrónica en la que se emplean anticuerpos específicos a organelos/estructuras que posteriormente son reconocidos a través de contratincciones, como la reportada por Martins *et al.* (2013). Se realiza esta recomendación en virtud de una valoración más precisa de las alteraciones o cambios causados por la criopreservación (o simplemente el estudio de cualquier otro protocolo) en embriones o gametos mamíferos para investigaciones futuras.

Las secciones semifinas y ultrafinas evaluadas en blastocistos bovinos y porcinos vitrificados en OPS (Vajta *et al.*, 1997; Fair *et al.*, 2001; Rizo *et al.*, 2002), fueron realizadas en embriones que se cultivaron *in vitro* durante 4 y 24 h después del calentamiento. Durante estos períodos de cultivo *in vitro*, fueron observados signos claros de regeneración a nivel ultraestructural, incluso en embriones cuya evaluación mediante microscopía estereoscópica después del calentamiento, mostraron signos graves de daño (Bettencourt *et al.*, 2009).

Estos signos de regeneración incluyen el restablecimiento de las uniones de contacto entre las células del TE y normalización de la morfología mitocondrial. En este estudio, se llevó a cabo la valoración con MET inmediatamente dos h de cultivo después de la vitrificación con el propósito de simular las condiciones que normalmente se practican con la TE a campo.

Es posible que la recuperación a largo plazo de embriones ocurra de manera natural en el útero, tal como ocurre *in vitro* (Overstrom *et al.*, 1993, Vajta *et al.*, 1997), lo que ayudaría a explicar las tasas de preñez y supervivencia embrionaria después de la transferencia de embriones vitrificados en contenedores *fibreplug* (Trigal *et al.*, 2011, 2012, Caamaño *et al.*, 2014) inmediatamente después del calentamiento.

Con los datos de recuperación, re-expansión de embriones criopreservados y el conteo de blastómeras totales y alteradas de los mismos que fueron presentados en este estudio, se puede afirmar que es posible el uso del método de vitrificación en *fibreplug* para criopreservar embriones bovinos mestizos. Sería necesario controlar estrictamente el tiempo de vitrificación, así como las condiciones ambientales bajo las cuales se realiza dicho protocolo, entre muchos otros factores para tratar de minimizar los daños crioinducidos. Igualmente, sería prudente confirmar el éxito de este método de vitrificación realizando transferencias de estos embriones a hembras receptoras para una mejor evaluación de la supervivencia de los mismos.

El desarrollo de nuevas alternativas para reducir de diversas maneras el estrés asociado con la criopreservación es fundamental para lograr una mejor comprensión de los principales cambios responsables de las bajas tasas de supervivencia tras el calentamiento. Estos hallazgos apuntan a la utilización de medios químicamente definidos durante la manipulación de ovocitos y embriones durante los procedimientos *in vitro* y la vitrificación (Horvath y Seidel, 2006).

Durante los últimos 20 años, diferentes grupos de investigación han dedicado una gran cantidad de trabajo a la mejora de los protocolos de vitrificación de embriones bovinos y han demostrado que la vitrificación ofrece buenos resultados cuando son criopreservados embriones bovinos (Gutnisky *et al.*, 2013). El mejoramiento de la PIV y la vitrificación son esenciales para el éxito de la TE. Con el avance de la biotecnología, se proponen cada vez más métodos para el estudio y entendimiento de estas fallas, que podrían ser superadas con el empleo y diseño de nuevos protocolos.

Con los conocimientos con los que se cuenta hasta ahora, en el área de la vitrificación embrionaria, los productores pudieran preservar líneas femeninas de alto valor genético, comercializar embriones en los que el padre haya sido escogido, continuar con el mantenimiento y producción de líneas de animales transgénicos, cuyas capacidades reproductivas son pobres y más aún, tomando en cuenta, que la producción de estas líneas es un proceso lento y costoso. Además de lo anteriormente expuesto, cuando esté completamente optimizada, la vitrificación de embriones tendrá muchas más aplicaciones.

CONCLUSIONES

1. El sistema de cultivo embrionario químicamente definido representado por el tratamiento con 0,1mg/mL de PVA es capaz de soportar el desarrollo embrionario hasta la etapa de blastocisto, de manera similar a los cultivos suplementados con BSA y FCS. El sistema de cultivo químicamente definido (mSOFaaci+PVA) es una alternativa para la PIV de embriones bovinos mestizos.
2. Los sistemas de cultivo PVA y BSA mostraron el mayor porcentaje de blastocistos, menor número de inclusiones lipídicas, al igual que el menor número de núcleos apoptóticos.
3. Los blastocistos bovinos mestizos producidos *in vitro* en los cuatro sistemas de cultivo no mostraron alteraciones ultraestructurales.
4. Los blastocistos bovinos (*Bos taurus indicus*) de 7 y 8 d de cultivo vitrificados en *fibreplug*, son capaces de sobrevivir al proceso de criopreservación empleado en este estudio.
5. Los blastocistos bovinos (*Bos taurus indicus*) vitrificados del grupo de PVA mostraron el menor número de núcleos apoptóticos a las 2 h después del calentamiento.
6. Dos h después de la vitrificación, los blastocistos mostraron daños celulares a nivel ultraestructural que incluían pérdida de microvellosidades, aumento en el número de vacuolas, cambios mitocondriales y desorganización del citoesqueleto.
7. La adición de EGF durante el cultivo post-calentamiento, no produjo ningún efecto sobre la supervivencia y calidad de los blastocisto bovinos mestizos producidos *in vitro*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

- Aardema, H., Roelen, B., van Tol, H., Oei, Ch., Gadella, B., Vos, P., 2013.** Follicular 17 β -estradiol and progesterone concentrations and degree of cumulus cell expansion as predictors of *in vivo*-matured oocyte developmental competence in superstimulated heifers. *Theriogenology*, 6:576-583
- Abd El Razek, M., Charpigny, G., Kodja, S., Marquant, B., Mermillod, P., Guyader, C., Humblot, P. 2000.** Differences in lipid composition between *in vivo* and *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology*, 53:346[Abstract].
- Abdalla, H., Shimoda, M., Hara, H., Morita, H., Kuwayama, M., Hirabayashi, M., Hoshi, S. 2010.** Vitrification of ICSI- and IVF-derived bovine blastocysts by minimum volume cooling procedure: effect of developmental stage and age. *Theriogenology*, 74: 1028-1035.
- AbdelHafez, F., Xu, J., Goldberg, J., Desai, N. 2011.** Vitrification in open and closed carriers at different cell stages: assessment of embryo survival, development, DNA integrity and stability during vapor phase storage for transport. *BMC Biotechnology*, 11:29.doi: 10.1186/1472-6750-11-29.
- Abe, H., Yamashita, S., Itoh, T., Satoh, T., Hoshi, H., 1999a.** Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Molecular Reproduction and Development*, 53:325-335.
- Abe, H., Yamashita, T., Itoh, T., Satoh, H., Hoshi. 1999.** Histochemical and ultrastructural evaluations of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing media. *Theriogenology*, 51:323-342.
- Abe, H., Yamashita, T., Satoh, T., Hoshi, H. 2002.** Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Molecular Reproduction and Development*, 61:57-66.
- Accardo, C., Dattena, M., Pilichi, S., Mara, L., Chessa, B., Cappai, P. 2004.** Effect of recombinant human FSH and LH on *in vitro* maturation of sheep oocytes; embryo development and viability. *Animal Reproduction Science*, 81:77-86.
- Adamson, E. 1993.** Two proto-oncogenes that play dual roles in embryonal cell growth and differentiation. *International Journal of Development Biology*, 37:111-116.
- Adriaens, I., Cortvrindt, R., Smitz, J. 2004.** Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence. *Human Reproduction*, 19:398-408.
- Agca, Y. 2000.** Cryopreservation of oocyte and ovarian tissue. *Ilar Journal*, 41:207-220.
- Agca, Y., Monson, R., Northey, D., Peschel, D., Schaefer, D., Rutledge, J. 1998.** Normal calves from transfer of biopsied, sexed and vitrified IVP bovine embryos. *Theriogenology*, 50:129-145.
- Aguilar, M., Galina, C., Merchant, H., Montiel, F., Canseco, R., Marquez, Y. 2002.** Comparison of stereoscopy, light microscopy and ultrastructural methods for evaluation of bovine embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 37:341-346.
- Akiyama, K., Kobayashi, J., Sato, Y., Sata, R., Ohashi, M., Sasaki, E., Oda, Y., Ogawa, Y., Ueda, S., Nabenishi, H., Matoba, S. 2010.** Calf production from vitrified bovine sexed embryos following in-straw dilution. *Animal Science Journal*, 81:461-466.
- Al-aghbari, A., Menino, A. 2002.** Survival of oocytes recovered from vitrified sheep ovarian tissues. *Animal Reproduction Science*, 71:101-110.
- Albuz, F., Sasseville, M., Lane, M., Armstrong, D., Thompson, J., Gilchrist, R. B. 2010.** Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): A novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Human Reproduction*, 25, 2999–3011.
- Al-Hasani, S., Diedrich, K., Van der Ven, H., Reinecke, A., Hartje, M., Krebs, D. 1987.** Cryopreservation of human oocytes. *Human Reproduction*, 2:695-700.
- Ali, A., Benkhalifa, M., Miron, P. 2006.** *In-vitro* maturation of oocytes: biological aspects. *Reproductive BioMedicine Online*, 13:437-446.
- Ali, A., Coenen, K., Bousquet, D., Sirard, M. 2004.** Origin of follicular bovine and its

- effect during *in vitro* maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, 62:1596-1606.
- Ali, A., Paradis, F., Vigneault, C. 2005.** The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Molecular Reproduction and Development*, 71:358-367.
- Al-Katanani, Y., Drost, M., Moson, R., Rutledge, C. Block, W., Hansen, P. 2002.** Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified *in vitro* produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology*, 58:171-182.
- Ambrose, J., Drost, M., Monson, R. Hansen, P. 1999.** Efficacy of timed embryo transfer with fresh or vitrified *in vitro* produced embryos to increase pregnancy rates heat-stressed dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 82:2369-76.
- Ambrosini, G., Adida, C., Altieri, D.C., 1997.** A novel anti-apoptotic gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Medicine*, 3:917-921.
- Ambrosini, G., Andrisani, A., Porcu, E., Rebellato, E., Revelli, A., Caserta, D., Cosmi, E., Marci, R., Moscarini, N. 2006.** Oocytes cryopreservation: State of art. *Reproductive Toxicology*, 22:250-262.
- Amorim, E., Graham, J., Spizziri, B., Meyers, M., Torres, C. 2009.** Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, 58:210-214.
- Anderiesz, C., Ferraretti, A., Magli, C., Fiorentino, A., Fortini, D., Gianaroli, L., Jones, G., Trouson, A. 2000.** Effect of recombinant human gonadotropins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development. *Human Reproduction*, 15:1140-1148.
- Anguita, B., Vandaele, L., Mateusen, B., Maes, D., Van Soom, A. 2007.** Developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, cumulus cells and blastocysts. *Theriogenology*, 67:537-549.
- Arav, A., Yavin, S., Zeron, Y., Natan, Y., Dekel, I., Gacitua, H. 2002.** New trend in gamete's cryopreservation. *Molecular Cell Endocrinology*, 187:77-81.
- Arav, A., Zeron, Y., Leslie, S., Behboodi, E., Anderson, G., Crowe, J., 1996.** Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. *Cryobiology*, 33: 589-599.
- Ardon, F., Suarez, S. 2013.** Cryopreservation increases coating of bull sperm by seminal plasma binder of sperm proteins BSP1, BSP3, and BSP5. *Reproduction*, 146:111-117.
- Armstrong, D. 2001.** Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology*, 55:1303-1322.
- Asada, M., Fukui, Y. 2000.** Effect on fertilization and development by re-culture after freezing and thawing of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, 54:889-898.
- Asada, M., Ishibashi, S., Ikumi, S., Fukui, Y. 2002.** Effect of polyvinyl alcohol (PVA) concentration during vitrification of *in vitro* matured bovine oocytes. *Theriogenology*, 58:1199-1208.
- Asaf, S., Leitner, G., Furman, O., Lavon, Y., Kalo, D., Wolfenson, D., Roth, Z. 2014.** Effects of *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in lactating cows on oocyte developmental competence. *Reproduction*, 147:33-43.
- Asgari, V., Hosseini, S., Forouzanfar, M., Hajian, M., Nasr-Esfahan, M. 2012.** Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos: Effect of embryonic block and developmental kinetics. *Cryobiology*, 65:278-283.
- Assidi, M., Dieleman, S., Sirard, M. 2010.** Cumulus cell gene expression following the LH surge in bovine preovulatory follicles: potential early markers of oocyte competence. *Reproduction*, 140:835-852.

B

- Báez, F., Hernández, L., Villamediana, P. 2008.** Estudio estructural del huso meiótico de ovocitos bovinos vitrificados. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 3:253-261.
- Báez, F., Landinez, J., Hernández Fonseca, H., Villamediana, P. 2010.** Evaluación del desarrollo embrionario de ovocitos bovinos madurados y fecundados *in vitro* obtenidos a partir de hembras mestizas *Revista de la Facultad de Agronomía de La Universidad del Zulia*, 27:460-478.
- Báez, F., Méndez, Y., Villamediana, P. 2014.** Complemento cromosómico de embriones bovinos (*Bos taurus indicus*) producidos *in vitro*. *Ciencia*, 22:14-20.

- Baguisi, A., Lonergan, P., Overstrom, E., Boland, M. 1999.** Vitrification of bovine embryos: incidence of necrosis and apoptosis. *Theriogenology*, 51:162 [Abstract].
- Balasubramanian, S., Rho, G. 2007.** Effect of cysteamine supplementation of *in vitro* matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. *Animal Reproduction Science*, 98:282-292.
- Barceló-Fimbres, M., Seidel, G. 2007.** Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid accumulation *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, 74:1406-1418.
- Barceló-Fimbres, M., Seidel, G. 2007a.** Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during *in vitro* culture of bovine embryos on embryonic development alter cryopreservation. *Molecular Reproduction and Development*, 74:1395-1405.
- Barceló-Fimbres, M., Seidel, G. 2011.** Cross-validation of techniques for measuring lipid content of bovine and blastocysts. *Theriogenology*, 75:434-444.
- Barnett, D., Bavister, B. 1996.** What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence?. *Molecular Reproduction*, 43:105-133.
- Barreto, L., Caiado Castro, V., García, J., Mingoti, G. 2007.** Role of roscovitine and IBMX on kinetics of nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, 99:202-207.
- Bavister, B. 2002.** Early history of *in vitro* fertilization. *Reproduction*. 124:181-196.
- Bavister, B., Rose-Hellekant, T. 1992.** Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*, 37:127-146.
- Beebe, L., Bouwman, E., McIlpatrick, S., Nottle, M., 2011.** Piglets produced *in vitro* blastocysts vitrified using the Cryologic Vitrification Method (solid surface vitrification) and a sealed storage container. *Theriogenology*, 75:1453-1458.
- Beging, I., Bhatia, B., Baldassarre, H., Dinnyes, A., Keefer, C. 2003.** Cryopreservation of goat oocytes and *in vivo* derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) method. *Theriogenology*, 59:1839-1850.
- Bettencourt, E., Bettencourt, C., Silva, J., Ferreira, P., de Matos, C., Oliveira, E., Romão, R., Rocha, A., Sousa, M. 2009.** Ultrastructural characterization of fresh and cryopreserved *in vivo* produced ovine embryos. *Theriogenology*, 71:974-958.
- Betts, D., King, A. 2001.** Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology*, 55:171-191.
- Bielanski, A. 2012.** A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices. *Theriogenology*, 77:467-482.
- Bilby, T., Block, J., Do Amaral, B., Sa, O., Silvestre, F., Hansen, P., Staples, C., Thatcher, W. 2006.** Effects of Dietary Unsaturated Fatty Acids on Oocyte Quality and Follicular Development in Lactating Dairy Cows in Summer. *Journal of Dairy Science*, 89:3891-3903.
- Bilodeau-Goeseels, S. Panich, P. 2002.** Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, 71:143-155.
- Bilton, R., Moore, N. 1976.** *In vitro* culture, storage and transfer of goat embryos. *Australian Journal of Biological Science*, 29:125-129.
- Block, J., Bonilla, L., Hansen, P. 2009.** Effect of addition of hyaluronan to embryo culture medium on survival of bovine *in vitro* following vitrification and establishment of pregnancy after transfer to recipients. *Theriogenology*, 71:1063-1071.
- Block, J., Bonilla, L., Hansen, P. 2010.** Efficacy of *in vitro* embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. *Journal of Dairy Science*, 93:5234-5242.
- Block, J., Hansen, P., Loureiro, B., Bonilla, L. 2011.** Improving post-transfer survival of bovine embryos produced *in vitro*: Actions of insulin-like growth factor-1, colony stimulating factor-2 and hyaluronan. *Theriogenology*, 76:1602-1609.
- Block, J., Wrenzycki, C., Niemann, H., Herrmann, D., Hansen, P. 2008.** Effects of insulin-like growth factor-1 on cellular and molecular characteristics of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Molecular*

- Reproduction and Development, 75:895-903.
- Bogliolo, L., Ariu, F., Fois, S., Rosati, I., Zeda, M., Leoni, G., succu, S., Pau, S., Ledda, S. 2007.** Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cummulus cells. *Theriogenology*, 68:1138-1149.
- Bols, P., Jorssen, E., Goovaerts, I., Langbeen, A., Leroy, J. 2012.** High throughput non-invasive oocyte quality assessment: the search continues. *Animal Reproduction*, 3:420-425.
- Brackett, B., Bousquet, D., Boice, M., Donawick, W., Evans, J., Dressel, M. 1982.** Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*, 27:147-158.
- Brison, D., Schultz, R. 1997.** Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming grow factor alpha. *Biology of Reproduction*, 56:1088-1096.
- Bronshteyn, V., Steponkus, P. 1995.** Nucleation and growth of ice crystals in concentrated solutions of ethylene glycol. *Cryobiology*, 32:1-22.
- Bruyère, P., Baudot, A., Guyader-Joly, C., Guérin, P., Louis, G., Buff, S. 2012.** Improved cryopreservation of *in vitro*-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. *Theriogenology*, 78:1294-1302.
- Bunel, A., Jorssen, E., Merck, E., Leroy, J., Bols, P., Sirard, M. 2015.** Individual bovine *in vitro* embryos production and cumulus cell transcriptomic analysis to distinguish cumulus-oocytes complexes with high or low development potential. *Theriogenology*, 83:228 [Abstract].
- Byrne, A., Southgate, J., Brison, D., Leese, H. 1999.** Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryos using TUNEL. *Journal Reproduction and Fertility*, 117:97-105.
- Byrne, A., Southgate, J., Brison, D., Leese, H. 2002.** Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin-like growth factor (IGF) superfamily. *Molecular Reproduction and Development*, 62:489-495.
- Byskov, A., Anderson, C., Hossaini, A., Guoliang, X. 1997.** Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiotic-activating substances when stimulated with FSH. *Molecular Reproduction and Development*, 46:296-305.
- ## C
- Caamaño, N., Gómez, E., Trigal, B., Muñoz, Carrocera, S., Martín, D., Díez, C. 2014.** Survival of vitrified *in vitro*-produced bovine embryos, after a one step warming/in-straw cryoprotectant dilution procedure. *Theriogenology*. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.11.021.
- Caínzos, J. 2012.** Diseño de un medio definido para la maduración *in vitro* en ovocitos bovinos en baja tensión de oxígeno. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 193 Pp.
- Camargo, O., Ruiz, T., Olivera, M. 2008.** Modelo teórico para explicar la acumulación de gotas lipídicas en embriones bovinos machos o hembras producidos *in vitro*. *Acta Biológica Colombiana*, 13:89-102.
- Carney, E., Foote, R. 1991.** Improved development of rabbit one-cell embryos to the hatching blastocyst stage by culture in a defined, protein-free culture medium. *Journal of Reproduction and Fertility*, 91:113 [Abstract].
- Carro, M., Buschiazzo, J., Ríos, G., Oresti, G., Alberio, R. 2013.** Linoleic acid stimulates neutral lipid accumulation in lipid droplets of maturing bovine oocytes. *Theriogenology*, 79:687-694.
- Carrol, J., Wood, M., Whittingham, D. 1993.** Normal fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes: protective action of certain macromolecules. *Biology of Reproduction*, 48:606-612.
- Carruyo, I., Báez, F., Montiel, X., Marcano, L., Torrealba, Z., Villamediana, P. 2010.** Maduración *in vitro* de ovocitos bovinos expuestos a diferentes concentraciones de plomo. *Boletín del Centro de investigaciones Biológicas*, 44:27-40.
- Cesari, A., Kaiser, G., Mucci, N., Mutto, A., Vincenti, A., Fornés, M., Alberio, R. 2006.** Integrated morphophysiological assessment of two methoDE for sperm selection in bovine embryo production *in vitro*. *Theriogenology*, 66:1185-1193.
- Cetin, Y., Bastan, A. 2006.** Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification in straws. *Animal Reproduction Science*, 92:29-36.

- Cha, K., Chung, H., Lim, J., Ko, J., Han, S., Choi, D., Yoon, T. 2000.** Freezing immature oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 169:43-47.
- Chankitisakul, V., Somfai, T., Inaba, Y., Techakumphu, M., Nagai, T. 2013.** Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine *in vitro* matured oocytes. *Theriogenology*, 79:590-598.
- Checura, C., Seidel, G. 2007.** Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes. *Theriogenology*, 67:919-930.
- Chen, C., Wang, C., Tsai, W., Hsieh, L., Wang, H., Soong, Y. 2004.** Evaluation of meiotic spindles in thawed oocytes after vitrification using polarized night microscopy. *Fertility and Sterility*, 82:666-672.
- Chen, S., Lien Y., Cheng, Y., Chen, H., Ho, H., Yang, Y. 2001.** Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Human Reproduction*, 16:2350-2356.
- Chenoweth, P. 2007.** Influence of male on embryo quality. *Theriogenology*, 68:308-315.
- Cho, SK., Cho, SG., Bae, IH., Park, Ch-S., Kong, Il-K. 2002.** Improvement in post-thaw viability of *in vitro*-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). *Animal Reproduction Science*. 73:151-158.
- Choi, Y., Carnevale, E., Seidel, Squire, E. 2001.** Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology*, 56:661-670.
- Cocero, M., Moreno, S., Aguilar, B. 2002.** Ultrastructural Characteristics of Fresh and Frozen-Thawed Ovine Embryos Using Two Cryoprotectants. *Biology of Reproduction*, 66:1244-1258.
- Cohen, J., Alikani, M., Trowbridge, J., Rosenwaks, Z. 1992.** Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Human Reproduction*, 7:685-688.
- Conaghan, J., Fischer, E. 2010.** Human blastocyst vitrification and warming: 3 years experience using the cryotip. The first International Congress on Controversies in cryopreservation of stem cell, reproductive cell, tissue & organs. Abstract. A6.
- Contri, A., Gloria, A., Robbe, D., Valorz, C., Wegher, L., Carluccio, A. 2013.** Kinematic study on the effect of pH on bull sperm function. *Animal Reproduction Science*, 136:252-259.
- Cooke, F., Pennington, K., Yang, Q., Ealy, A. 2009.** Several fibroblast growth factors are expressed during pre-attachment bovine conceptus development and regulate interferon-tau expression from trophectoderm. *Reproduction*, 137:259-209.
- Corrêa, G., Rumpf, R., Mundim, T., Franco, M., Dode, M. 2008.** Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos effect in production and expression of gene related to oxidative stress. *Animal Reproduction Science*, 104: 132-142.
- Coskun, S., Sanbuissho, A., Lin, Y., Rikihisaz, Y. 1991.** Fertilizability and subsequent developmental ability of bovine oocytes matured in medium containing epidermal growth factor (EGF). *Theriogenology*, 36:485-494.
- Costa, N., Cordeiro, M., Silva, T., Sastre, D., Santana, P., Sá, A., Sampaio, R., Santos, S., Adona, P., Miranda, M., Ohashi, O. 2013.** Effect of triiodothyronine on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, 80:295-301.
- Coy, P., Romar, R., Payton, R., McCann, L., Saxton, A., Edwards, J. 2005.** Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes using the S-enantiomer of roscovitine: effects on maturation, fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Reproduction*, 129:19-26.
- Crosier, A., Farin, P., Dykstra, M., Alexander, J., Farin, C. 2000.** Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced *in vivo* or *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 62:1459-1465.
- Crosier, A., Farin, P., Dykstra, M., Alexander, J., Farin, C. 2001.** Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 64:1375-1385.
- Crozet, N., Dumont, M. 1984.** The site of the acrosome reaction during *in vivo* penetration of the sheep oocyte. *Gamete Research*, 10:97-105.

- Cuello, C., Berthelot, F., Delaleu, B., Venturi, E., Pastor, L., Vazquez, J., Roca, J., Martinat-Botté, F., Martinez, E. 2007.** The effectiveness of the stereomicroscopic evaluation of embryo quality in vitrified-warmed porcine blastocysts: An ultrastructural and cell death study. *Theriogenology*, 67:970-982.
- Cui, X., Jeong, Y., Lee, H., Cheon, S., Kim, N. 2004.** Fetal bovine serum influences apoptosis and apoptosis-related gene expression in porcine parthenotes developing *in vitro*. *Reproduction*, 127:125-130.
- ## D
- Da Silva, M., Metelo, R. 2005.** Relation between physical properties of zona pellucida and viability of bovine embryos after slow-freezing and vitrification. *Reproduction in Domestic Animal*, 40:205-209.
- Dalvit, G., Llanes, S., Descalzo, A., Insani, M., Beconi, M., Cetica, P. 2005.** Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid in bovine oocyte *in vitro* maturation. *Reproduction in Domestic Animal*, 40:93-97
- Darzynkiewicz, Z., Bedner, E., Traganos, F. 2001.** Difficulties and pitfalls in analysis of apoptosis. *Methods in Cell Biology*, 63:527-46.
- de Castro e Paula, L., Hansen, P. 2007.** Interactions between oxygen tension and glucose concentration that modulate actions of heat shock on bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Theriogenology*, 68:763-770.
- De La Torre-Sanchez, J., Prieis, K., Seidel, G. 2006.** Metabolic regulation of *in-vitro*-produced bovine embryos. II. Effects of phenazine ethosulfate, sodium azide and 2,4-dinitrophenol during post-compaction development on glucose metabolism and lipid accumulation. *Reproduction, Fertility and Development*. 18:597-607.
- De Leon, P., Campos, V., Corcini, V., Santos, E., Rambo, G., Lucia, T., Deschamps, J., Collares, T. 2012.** Cryopreservation of immature equine oocytes, comparing a solid surface vitrification process with open pulled straws and the use of a synthetic ice blocker. *Theriogenology*, 77:21-27.
- de Vries W, Larsson B, Rodriguez-Martinez H. 2000.** Hyaluronan improves *in vitro* maturation when bovine oocytes are cultured singly or in small groups. *Theriogenology*, 53:451.
- De Vries, J., Vork, M., Roemen, T., de Jong, Y., Cleutjens, J., van der Vusse, G., van Bilsen, M. 1997.** Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. *Journal of Lipid Research*, 38:1384-1394.
- Demyda-Peyrás, S., Dorado, J., Hidalgo, M., Anter, J., De Luca, L., Genero, E., Moreno-Millán, M. 2012.** Effects of oocyte quality, incubation time and maturation environment on the number of chromosomal abnormalities in IVF-derived early bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, doi.org/10.1071/RD12140.
- Desai, N., Szeptycki, J., Scott, M., AbdelHafez, F., Goldfarb, J. 2008.** Artificial collapse of blastocysts before vitrification: mechanical vs. laser technique and effect on survival, cell number, and cell death in early and expanded blastocysts. *Cell Preservation Technology*, 6:181-190.
- Dey, S., Deb, G., Ha, A., Lee, J., Bang, J., Lee, K., Kong, I. 2012.** Coculturing denuded oocytes during the *in vitro* maturation of bovine cumulus oocyte complexes exerts a synergistic effect on embryo development. *Theriogenology*, 77:1064-1077.
- Dhali, A., Anchamparuthy, V., Butler, S., Pearson, R., Mullarky, I., Gwazdauskas, F. 2009.** Effect of droplet vitrification on development competence, actin cytoskeletal integrity and gene expression in *in vitro* cultured mouse embryos. *Theriogenology*, 71:1408-1416.
- Dhali, A., Manik, R., Das, S., Singla, S., Palta, P. 2000.** Post-vitrification survival and *in vitro* maturation rate of buffalo (*Bubalis bubalis*) oocytes: effect of ethylene glycol concentration and exposure time. *Animal Reproduction Science*, 63:159-165.
- Díez, C., Duque, P., Gómez, E., Hidalgo, C., Tamargo, C., Rodríguez, A., Fernández, L., De la Vega, S., Fernández, A., Facal, N., Carbajo, M. 2005.** Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. *Theriogenology*, 64:317-333.
- Díez, C., Heyman, Y., Le Bourhis, D., Guyader-Joly, C., Degrouard, J., Renard, J. 2001.**

- Delipidating *in vitro*-produced bovine zygotes: Effect on further development and consequences for freezability. *Theriogenology*, 55: 923-36.
- Díez, C., Muñoz, M., Caamaño, JN., Gómez, E. 2012.** Cryopreservation of the Bovine Oocyte: Current Status and Perspectives. *Reproduction in Domestic Animals*, 47:76-83.
- Dinnyés A, Lonergan P, Fair T, Boland MP, Yang X. 1999.** Timing of the first cleavage post-insemination affects cryosurvival of *in vitro*-produced bovine blastocysts. *Molecular Reproduction and Development*, 53:318-24.
- Dinnyés, A., Dai, Y., Jiang, S., Yang, X. 2000.** High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction*, 63:513-518.
- Dobrinsky, J. 1996.** Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, 45:17-26.
- Dobrinsky, J., Pursel, V., Long, C., Johnson, L. 2000.** Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biology of Reproduction*, 62:564-570.
- Dochi, O., Yamamoto, Y., Saga, H., Yoshiba, N., Kano, N., Maeda, J., Miyata, K., Yamauchi, A., Tominaga, K., Oda, Y., Kanashima, T., Inohae, S. 1998.** Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology*, 49:1051-1059.
- Dode, M., Adona, P. 2001.** Developmental capacity of *Bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-dimethylaminopurine. *Animal Reproduction Science*, 65:171-180.
- Dominko, T., First, N. 1997.** Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. *Molecular Reproduction and Development*, 47:456-467.
- Donnay, I., R. de Roover, A. Van Langendonck, P. Auquier, P. Bombaerts, T. Kinnar, N. Schuurbiens, M. Dive, A. Massip and F. Dessy. 1996.** Production d'embryons bovins *in vitro* à partir d'ovocytes prélevés sur vaches vivantes par ponction échoguidée. *Premiers résultats. Annales Médecine Vétérinaire*, 140:283-291.
- Dorland, M., Gardner, D., Trounson, A. 1994.** Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 13:25 [Abstract].
- Dovolou, E., Periqueta, E., Messinis, I., Tsiligianni, T., Dafopoulos, K., Gutierrez-Adán, A., Amiridis, G., 2014.** Daily supplementation with ghrelin improves *in vitro* bovine blastocysts formation rate and alters gene expression related to embryo quality. *Theriogenology*, 81:565-571.
- Du, Y., Pribenszky, C., Molnár, M., Zhang, M., Yang, X., Kumayama, M., Pedersen, A., Villemoes, K., Bolnd, L., Vajta, G. 2008.** High hydrostatic pressure: a new way to improve *in vitro* developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification. *Reproduction*, 153:13-17.
- Dubby, R., Hill, J., O'Callaghan, D., Overstrom, E., Boland, M. 1997.** Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts. *Theriogenology*, 47:332.
- Dunning, K., Cashman, K., Russell, J., Thompson, J., Norman, R., Robker, R. 2010.** Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biology of Reproduction*, 83:909-918.
- Duque, P., Gómez, E., Díaz, E., Facal, N., Hidalgo, C., Díez, C. 2003.** Use of two replacements of serum during bovine embryo culture *in vitro*. *Theriogenology*, 59:889-899.
- Duranthon, V., Renard, J. 2001.** The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology*, 55:1277-1289.

E-F

- Eckert, J., Pugh, P., Thompson, J., Niemann, H., Tervit, H. 1998.** Exogenous protein affects developmental competence and metabolic activity of bovine pre-implantation embryos *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*, 10:327-332.

- Edwards, L., Williams, D., Gardner, D. 1998.** Intracellular pH of the preimplantation mouse embryo: effects of extracellular pH and weak acids. *Molecular Reproduction and Development*, 50:434-442.
- Edwards, R. 1965.** Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208:349-351.
- Elnahas, A., Alcolak, E., Abu, E., Elnahas, T., Elnahas, K., Palapelas, V., Diedrich, K., Al-Hasani, S. 2010.** Vitrification of human oocytes and different development stages of embryos: An overview. *Middle East Fertility Journal*, 15:2-9.
- Emiliani, S., Van der Bergh, M., Vannin, A., Biramane, J., Englert, Y. 2000.** Comparison of ethylene glycol, 1,2 propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. *Human Reproduction*, 15:905-910.
- Epifano, O., Dean, J. 1994.** Biology and structure of zone pellucida: a target for immunocontraception. *Reproduction and Fertility Development*, 6:319-330.
- Eppig, R., Schroeder, A. 1986.** Culture systems for mammalian oocyte development: progress and prospect. *Theriogenology*, 25:106 [Abstract].
- Eroglu, A., Coth, T., Toner, M. 1998.** Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes. *Fertility and Sterility*, 69:944-957.
- Evenson, D., Wixon, R. 2006.** Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*, 65:979-991.
- Fabbri, R., Porcu, E., Marsella, T., Primavera, M., Rocchetta, G., Ciotti, P., Magrini, O., Saracchioli, N., Venturoli., Flamigni, C. 2000.** The technical aspects of Oocyte Cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 169:39-42.
- Fabian, D., Gjørret, J., Berthelot, F., Martinatbotte, F., Maddox-Hyttel, P. 2005a.** Ultrastructure and cell death of *in vivo* derived and vitrified porcine blastocysts. *Molecular Reproduction and Development*, 70:155-165.
- Fabian, D., Koppel, J., Maddox-Hyttel, P. 2005.** Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology*, 64:221-231.
- Fahy, G. 1986.** The Relevance of Cryoprotectant "Toxicity" to Cryobiology. *Cryobiology*, 23:1-13.
- Fahy, G., Rall, W. 2007.** Vitrification: an overview. *Vitrification in Assisted Reproduction. A user's manual and trouble-shooting guide.* Edited by Michael J. Tucker and Juergen Liebermann. Chapter 1A. Page: 1-20.
- Fair, T., Lonergan, P., Dinnyes, A., Hyttel, P., Ward, F., Boland, M. 2001.** Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of embryo production on blastocysts quality. *Molecular Reproduction and Development*, 58:186-195.
- Farin, P., Crosier, A., Farin, C. 2001.** Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology*, 55:151-170.
- Ferguson, E., Leese, H. 1999.** Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *Reproduction and Fertility*, 116:373-378.
- Ferguson, E., Leese, H. 2006.** A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Reproduction*, 73:1195-11201.
- Ferreira, E., Vireque, A., Adona, P., Ferriani, R., Navarro, P. 2009a.** Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I reversibly arrests meiosis without increasing meiotic abnormalities after *in vitro* maturation. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 145:76-80
- Ferreira, E., Vireque, A., Adona, P., Meirelles, F., Ferriani, R., Navarro, P. 2009.** Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, 71:836-848.
- Feugang, J., Camargo-Rodríguez, O., Memili, E. 2009.** Culture systems for bovine embryos. *Livestock Science*, 121:141-149.
- Feugang, J., Van Langendonck, A., Sayoud, H., Rees, J., Pampfer, S., Moens, A., Dessy, F., Donnay, I. 2003.** Effect of prooxidant agents added at the morula/blastocyst stage on bovine embryo development, cell death and glutathione content. *Zygote*, 11:107-118.
- Fischer, B., Bavister, B. 1993.** Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys,

- hamster and rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99:673-679.
- Fonseca, H., Sirisathien, S., Bosh, P., Cho, H., Lott, J., Hawkiins, L., Hollet, R., Coley, S., Bracket, B. 2002.** Offspring resulting from direct transfer of cryopreserved bovine embryos produced *in vitro* in chemically defined media. *Animal Reproduction Science*, 69:151-158.
- Fong, C., Bongso, A., Sathananthan, H., Ho, J., Ng, S. 2001.** Ultrastructural observations of enzymatically treated human blastocysts: zona free blastocyst transfer and rescue of blastocysts with hatching difficulties. *Human Reproduction*, 16:540-546.
- Fouladi-Nashta, A., Alberio, R., Kafi, M., Nicholas, B., Campbell, K., Webb, R. 2005.** Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in preimplantation bovine embryos. *Reproductive Biomedicine Online*, 10:497-502.
- Frei, M. 2004.** Desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos bovinos fecundados con espermatozoides adheridos al cumulus. Tesis de Grado. Universidad Católica de Temuco. Chile. 45p.
- Fu, X., Shi, W., Zhang, Q., Zhao, X., Yan, Ch., Hou, Y., Zhou, G., Fan, Z., Suo, L., Wusiman, A., W, Y., Zhu, S. 2009.** Positive effect of taxol pretreatment on morphology, distribution and ultrstructure of mitochondria and lipid droplets in vitrification of *in vitro* matured porcine oocytes. *Animal Reproduction Science*, 115:158-168.
- Fukui, Y., Glem, A., Gandolfi, T., Moor, R. 1998.** Ram-specific effects on *in vitro* fertilization and cleavage of sheep oocytes matured *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 82:337-340.
- Fakruzzaman, M., Bang, J., Lee, K., Kim, S., Ha, A., Ghanem, N., han, Ch., Cho, K., White, K., Kong, Il. 2013.** Mitochondrial content and gene expression profiles in oocyte-derived embryos of cattle selected on the basis of brilliant cresyl blue staining. *Animal Reproduction Science*, 142:19-27.
- G**
- Galli, C., Crotti, G., Notari, C., Turini, P., Duchi, R., Lazzari, G. 2001.** Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, 55:1341-1357.
- Galli, C., Duchi, R., Crotti, G., Turini, P., Ponderato, N., Colleoni, S., Lagutina, I., Lazzari, G. 2003.** Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, 59:599-616.
- Gandhi, A., Lane, M., Gardner, D., Krisher, R. 2000.** A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Human Reproduction*, 15:395-401.
- Gardner, D. 1999.** Development of serum-free culture systems for the ruminant embryo and subsequent assessment of embryo viability. *Journal of Reproduction and Fertility*, Supp. 54:461-475.
- Gardner, D., Lane, M. 1998.** Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Human Reproduction*, 13:148-159.
- Gardner, D., Lane, M. 2014.** Culture of viable mammalian embryos *in vitro*. Chapter 6. In *Principles of cloning (Second Edition)*. Academic Press, pages 63-84. doi: 10.1016/B978-0-12-386541-0.00006-0.
- Gardner, D., Lane, M., Spitzer, A., Batt, P. 1994.** Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: Amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulated development. *Biology of Reproduction*, 50:390-400.
- Gardner, D., Sheehan, C., Rfienzi, L., Katz-Jaffe, M., Larman, M. 2007.** Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Theriogenology*, 67:64-72.
- Gardner, M., Lane, M., Lane, M. 2000.** EDTA stimulates cleavage stage bovine embryo development in culture but inhibit blastocyst development and differentiation. *Molecular Reproduction and Development*, 57:256-261.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S. 1992.** Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology*, 119:493-501.
- Genicot, G., Leroy, J., Soom, A., Donnay, I. 2005.** The use of a fluorescents dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. *Theriogenology*, 63:1181-1194.
- George, F., Daniaux, C., Genicot, G., Verhaeghe, B., Lambert, P., Donnay, I.**

2008. Set up of a serum-free culture system for bovine embryos: embryo development and quality before and after transient transfer. *Theriogenology*, 69:612-623.
- George, F., Vrancken, M., Verhaeghe, B., Verhoeve, F., Schneider, Y-J., Massip, A., Donnay, I. 2006.** Freezing of *in vitro* produced bovine embryos in animal protein-free medium containing vegetal peptones. *Theriogenology*, 66:1381-1390.
- George, M., Johnson, M., Vincent, C. 1992.** Use of fetal bovine serum to protect against zona hardening during preparation of mouse oocytes for cryopreservation. *Human Reproduction*, 7:408-412.
- Ghanem, N., Ha, A., Fakruzzaman, M., Bang, J., Lee, S., Kong, I. 2014.** Differential expression of selected candidate genes in bovine embryos produced *in vitro* and cultured with chemicals modulating lipid metabolism. *Theriogenology*, 82:238-250.
- Gibb, C., Poronnik, P., Day, M., Cook, D. 1997.** Control of cytosolic pH in two-cell mouse embryos: roles of H(+)-lactate cotransport and Na+/H+ exchange. *The American Journal of Physiology*, 273:C404-419.
- Gilchrist, R., Thompson, J. 2007.** Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. *Theriogenology*, 67:6-15.
- Gjørret, J., Knijn, H., Dieleman, S., Avery, B., Larsson, L., Maddox-Hyttel, P. 2003.** Chronology of apoptosis in bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 69:1193-200.
- Gómez, E., Díez, C. 2000.** Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, 58:23-37.
- Gómez, E., Muñoz, M., Rodríguez, A., Caamaño, J., Facal, N., Díez, C. 2009.** Vitrification of bovine blastocysts produced *in vitro* inflicts selective damage to the inner cell mass. *Reproduction in domestic animals*, 44:194-199.
- Gómez, E., Rodríguez, A., Muñoz, M., Caamaño, J., Hidalgo, C., Morán, E., Facal, N., Díez, C. 2008.** Serum free embryo culture medium improves *in vitro* survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology*, 69:1013-1021.
- Goovaerts, I., Leroy, J., Jorssen, E., Bols, P. 2010.** Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte cultura. *Theriogenology*, 74:1509-1520.
- Goovaerts, I., Leroy, J., Rizos, D., Bermejo-Alvarez, P., Gutierrez-Adan, A., Jorssen, E., Bols, P. 2011.** Single *in vitro* bovine embryo production: Coculture with autologous cumulus cells, developmental competence, embryo quality and gene expression profiles. *Theriogenology*, 76:1293-1303.
- Goovaerts, I., Leroy, J., Rizos, D., Bermejo-Alvarez, P., Gutierrez-Adan, A., Jorssen, E., Bols, P. 2011.** Single *in vitro* bovine embryo production: Coculture with autologous cumulus cells, developmental competence, embryo quality and gene expression profiles. *Theriogenology*, 76:1293-1303.
- Gordon I. Embryo transfer and associated techniques in goats. 1997.** In Gordon I (ed.): *Controlled Reproduction in Sheep and Goats*, CAB International, University Press, Cambridge, 416-439.
- Gordon, I. 1994.** Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, Oxon, UK: CAB International.
- Gordon, I. 1996.** Embryo transfer and associated techniques in cattle. In Gordon I (ed.): *Controlled Reproduction in Cattle and Buffaloes*, CAB International, University Press, Cambridge, 245-371.
- Gordon, I., Lu, K. 1990.** Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology*, 33:77-87.
- Granlund, L., Pedersen, J., Nebb, H. 2005.** Impaired lipid accumulation by *trans 10, cis 12* during adipocyte differentiation is dependent on timing and length of treatment. *Biochemistry Biophys Acta*, 1687:11-22.
- Gualtieri, R., Barbato, V., Fiorentino, I., Braun, S., Rizos, Longobardi, S., Talevi, R. 2014.** Treatment with zinc, D-aspartate, and coenzyme Q10 protects bull sperm against damage and improves their ability to support embryo development. *Theriogenology*, 82:592-582.
- Guemra, S., da Silva Santo, E., Zanin, R., Monzani, P., Sovernigo., Canan, T., Mitio, O., Verde, C., Adona, P. 2014.** Effect of temporary meiosis block during prematuration of bovine cumulus-oocyte complexes on pregnancy rates in a commercial setting for *in vitro* embryo production. *Theriogenology*, 81:982-987.
- Guimarães, A., Pereira, S., Leme, L., Dode, M. 2015.** Evaluation of simulated physiological oocyte maturation for

- improving bovine *in vitro* embryo produced. *Theriogenology*, 83:52-57.
- Guler, A., Poulin, N., Mermillod, P., Terqui, M., Cognié, Y. 2000.** Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on *in vitro* matured of sheep oocytes. *Theriogenology*, 54:209-218.
- Gutiérrez-Adán, A., Lonergan, P., Rizos, D., Ward, F., Boland, M., Pintado, B., De la Fuente, J. 2001.** Effect of *in vitro* culture systems on the kinetics of blastocysts development and sex ration of bovine embryos. *Theriogenology*, 55:1117-1126.
- Gutiérrez-Adán, A., Pérez, M., Fernández, R., Ramirez, R., Moreira, P., Pintado, B. 2006.** Developmental consequences of sexual dimorphism during pre-implantation embryonic development. *Reproduction in Domestic Animal*, 41(Suppl 2):54-62.
- Gutnisky, C., Alvarez, G., Cetica, P., Dalvit, G. 2013.** Evaluation of the Cryotech Vitrification Kit for bovine embryos. *Cryobiology*, 67:391-393.
- ## H
- Ha, A., Park, H., Jin, J., Lee, S., Ko, D., Lee, D., White, K., Kong, I. 2014.** Postthaw survival of *in vitro*-produced bovine blastocysts loaded onto the inner surface of a plastic vitrification straw. *Theriogenology*, 81:467-473.
- Ha, A., Lee, S., Jeon, J., Park, H., Lee, S., Jin, J., Sessions, B., Wang, Z., White, K., Kong, I. 2014a.** Development of a modified straw method for vitrification of *in vitro*-produced bovine blastocysts and various genes expression in between the methods. *Cryobiology*, 68:57-64.
- Hammond, D., Wang, S., Holyoak, G. 2000.** Effects of ammonia during different stages of culture on development of *in vitro* produced bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, 59:23-30.
- Han, Y., Yamashina, H., Koyama, N., Lee, K., Fukui, Y. 1994.** Effects of quality and developmental stage on the survival of IVF-derived bovine blastocysts cultured *in vitro* after freezing and thawing. *Theriogenology*, 42:645-654.
- Handyside, A., Hunter S. 1986.** Cell division and death in the mouse blastocyst before implantation. *Roux's Archives of Developmental Biology*, 195:519-26.
- Hansen, P., Block, J., Loureiro, B., Bonilla, L., Hendricks, E. 2010.** Effect of gamete source and culture conditions on the competence of *in vitro*-produced embryos for post-transfer survival in cattle. *Reproduction Fertility and Development*, 22:59-66.
- Hara, H., Hwang, I., Kagawa, N., Kuwayama, M., Hirabayashi, M., Hochi, S. 2012.** High incidence of multiple aster formation in vitrified-warmed bovine oocytes after *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 77:908-915.
- Hardy, K. 1999.** Apoptosis in the human embryos. *Reproduction*, 4:125-134.
- Harper, K., Brackett, B. 1993.** Bovine blastocyst development after *in vitro* maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biology of Reproduction*, 48:409-416.
- Hartshorne, G. 2000.** Embryo. *Human Reproduction*, 15:31-41.
- Hasler, J. 1998.** The current status of oocyte recovery, *in vitro* embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine. *Journal of Animal Science*, 76:52-74.
- Hasler, J. 2014.** Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, 81:152-169.
- Hasler, J., Henderson, W., Hurtgen, P., Jin, Z., Mc Cauley, A., Mower, S., Neely, B., Shuey, L., Stokes, J., Trimmer, A. 1995.** Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43:141-152.
- Hawk, H., Wall, R. 1994.** Improve yields of bovine blastocysts from *in vitro* produced oocytes. *Theriogenology*, 41:787-796.
- Hayashi, S., Kobayashi, I., Mizuno, K., Saitoh, K., Hirano, S. 1989.** Birth of piglets from frozen embryos. *Veterinary Record*, 125:43 [Abstract].
- Hernández-Fernández, A., Hernández-Fonseca, H. 2010.** Efecto de la suplementación con L-cisteína en la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos. *Revista Científica FCV-LUZ*, 3:268-273.
- Hernandez-Fonseca, H., Sirisathien, S., Bosch, P., Cho, H., Lott, J., Hawkins, L., Hollett, R., Coley, S., Brackett, B. 2002.** Offspring resulting from direct transfer of cryopreserved bovine embryos produced *in*

- in vitro* in chemically defined media. *Animal Reproduction Science*, 69:151-158.
- Herrera, C., Morikawa, M., Castex, C., Pinto, M., Ortega, N., Fanti, T., Garaguso, R., Franco, M., Castañares, M., Castañeira, C., Losinno, L., Miragaya, M., Mutto, A. 2015.** Blastocoele fluid from *in vitro* and *in vivo* produced equine embryos contains nuclear DNA. *Theriogenology*, 83:415 [Abstract].
- Hill, B., Kuehner, L. 1998.** Bovine donor cholesterol, embryo colour and embryo freezability. *Theriogenology*, 49:168 [Abstract].
- Ho, Y., Doherty, A., Schultz, R. 1994.** Mouse preimplantation embryo development *in vitro*: effect of sodium concentration in culture media on RNA synthesis and accumulation and gene expression. *Molecular Reproduction Development*, 38: 131-141.
- Hochi, S., Abdalla, H., Hara, H., Shimoda, M., Morita, H., Kuwayama, M., Hirabayashi, M. 2010.** Stimulatory effect of Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) inhibitor on revivability of *in vitro*-produced bovine blastocysts after vitrification. *Theriogenology*, 73:1139-1145.
- Hochi, S., Akiyama, M., Minagawa, G., Kimra, K., Hanada, A. 2001.** Effect of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of *in vitro*-matured bovine oocytes. *Cryobiology*, 41: 69-73.
- Holm, P., Booth, P.J., Schmidt, M.H., Greve, T., Callesen, H. 1999.** High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myoinositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*, 52:683-700.
- Holm, P., Booth, P., Callesen, H. 2002.** Kinetics of early *in vitro* development of bovine *in vivo*- and *in vitro*-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reproduction*, 123:553-565.
- Horvath, G., Siedel, G. 2006.** Vitrification of bovine oocytes alter treatment with cholesterol-loaded methyl- β -cyclodextrin. *Theriogenology*, 66:1026-1033.
- Hou, Y., Dai, Y., Z, S., Zhu, H., Wu, T., Gong, G.C., Wang, H., Wang, L., Liu, Y., Li, R., Wan, R., Li, N. 2005.** Bovine oocytes vitrified by open pulled straw method and used for somatic cell cloning supported development to term. *Theriogenology*, 64:1381-1391.
- Huang, W., Nagano, M., Kang, S., Yanagawa, Y., Takahashi, Y. 2013.** Effects of *in vitro* growth culture duration and prematuration culture on maturational and developmental competences of bovine oocytes derived from early antral follicles. *Theriogenology*, 80:793-799.
- Hunzicker, M., Maizels, E. 2006.** FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cell Signal*, 18:1351-1359.
- Hur, Y., Park, J., Ryu, E., Yoon, H., Yoon, S., Hur, Ch., Lee, W., Lim, J. 2011.** Effect of artificial shrinkage on clinical outcome in fresh blastocyst transfer cycles. *Clinical Experimental in Reproductive Medicine*, 38:87-92.
- Hurt, A., Landim-Alvarenga, F., Siedel, G., Squires, E. 2000.** Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology*. 54: 119-128.
- Hyttel, P., Vajta, G., Callesen, H. 2000.** Vitrification of bovine oocytes with the open pulled straw method: ultrastructural consequences. *Molecular Reproduction and Development*, 56: 80-88.

I-J

- Iga, K., Niwa, K., Bartke, A. 1998.** Recombinant bovine growth hormone stimulates nuclear maturation of bovine oocytes *in vitro* and promotes subsequent embryonic development. *Journal of Reproduction and Development*, 44:45-52.
- Isachenko, V., Soler, C., Isachenko, E. 1998.** Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology*, 36:250-253.
- Isobe, T., Ikebata, Y., Onitsuka, T., Wittayarat, M., Sato, Y., Taniguchi, M., Otoi, T. 2012.** Effect of sericin on preimplantation development of bovine embryos cultured individually. *Theriogenology*, 78:747-752.
- Iwasaki, S., Yoshida, N., Ushijima, H., Watanabe, S., Nakahara, T. 1990.** Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in*

- vitro* and *in vivo*. Journal of Reproduction and Fertility, 90:279-284.
- Izadyar, F., Hage, W., Colenbrander, B., Bevers, M. 1998.** The promontory effect of growth hormone on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmatic maturation. Molecular Reproduction and Development, 49:444-453.
- Izadyar, F., Zeinstra, E., Bevers, M. 1998a.** Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes. Molecular Reproduction and Development, 51:339-345.
- Izquierdo, M. 1996.** Cultivo de embriones caprinos producidos *in vitro*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, España. 278 p.
- Jacobson, M., Weil, M., Raff, M. 1997.** Programmed cell death in animal development. Cell, 88:347-354
- Janowski, D., Salilew-Wondim, D., Torner, H., Tesfaye, D., Ghanem, N., Tomek, W., El-Sayed, A., Schellander, A., Hölker, M. 2012.** Incidence of apoptosis and transcript abundance in bovine follicular cells is associated with the quality of the enclosed oocyte. Theriogenology, 78:656-669.
- Jeon, K., Kim, E., Tae, J., Lee, Ch., Lee, K., Kim, Y., Jeong, D., Cho, S., Kim, J., Lee, Y., Riu, K., Cho, S., Park, S. 2008.** Survivin protein expression in bovine follicular oocytes and their *in vitro* developmental competence. Animal Reproduction Science, 108:319-333.
- Jeong, W., Cho, S., Lee, H., Deb, G., Lee, Y., Kwon, T., Kong, I. 2009.** Effect of cytoplasmic lipid content on *in vitro* developmental efficiency of bovine IVP embryos. Theriogenology, 72:584-589.
- Jiménez-Trigos, E., Vicente, J., Mocé, E., Naturil-Alfonso, C., Fernandez-Gonzalez, R., Gutierrez-Adan, A., Marco-Jiménez, F. 2013.** Treatment with cholesterol-loaded methyl- β -cyclodextrin increased the cholesterol in rabbit oocytes, but did not improve developmental competence of cryopreserved oocytes. Cryobiology, 67:106-108.
- Jin, B., Kawai, Y., Hara, T., Takeda, S., Seki, S., Nakata, Y. 2011.** Pathway for the movement of water and cryoprotectants in bovine oocytes and embryos. Biology of Reproduction, 85:834-847.
- Jo, H., Bang, J., Kim, S., Choi, B., Jin, J., Kim, H., Jung, I., Suh, T., Ghanem, N., Wang, Z., Kong, I. 2014.** Production of female bovine embryos with sex-sorted sperm using intracytoplasmic sperm injection: Efficiency and *in vitro* developmental competence. Theriogenology, 81:675-682.
- Johnson, M., Pickering, S. 1987.** The effect of dimethylsulfoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. Development, 100:313-324.
- Jousan, F., Hansen, P. 2004.** Insulin-like Growth Factor-I as a Survival Factor for the Bovine Preimplantation Embryo Exposed to Heat Shock. Biology of Reproduction, 71:1665-1670.
- Juriscova, A., Latham, E., Casper, R., Varmuza, S. 1998.** Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. Mol Reproduction and Development, 51:243-253.
- Juriscova, A., Varmuza, S., Casper, R. 1995.** Involvement of programmed cell death in preimplantation embryo demise. Human Reproduction Update, 1:558-566.

K

- Kably, A., Baptista, A., Ruiz, J. 2002.** Falla inesperada en la fertilización *in vitro* convencional: reinseminación con ICSI o indicación de ICSI en ciclos subsecuentes. Ginecología y Obstetricia Mexicana, Vol. 70, N°8. ISSN 0300-9041.
- Kaidi, S., Van Langendonck, A., Massip, A., Dessy, F., Donnay, I. 1999.** Cellular alteration after dilution of cryoprotective solutions used for the vitrification of *in vitro*-produced bovine embryos. Theriogenology, 52:515-525.
- Kamjoo, M., Brison, D., Kimber, S. 2002.** Apoptosis in the preimplantation mouse embryo: effect of strain difference and *in vitro* culture. Molecular Reproduction and Development, 61:67-77.
- Kawamura, K., Kawamura, N., Kumagai, J., Fukuda, J., Tanaka, T. 2007.** Tumor Necrosis Factor Regulation of Apoptosis in Mouse Preimplantation Embryos and Its Antagonism by Transforming Growth Factor Alpha/Phosphatidylinositol 3-

- Kinase Signaling System. *Biology of Reproduction*, 76:611-618.
- Kawarsky, S., Basrur, P., Stubbings, R., Hansen, P., King, W. 1996.** Chromosomal abnormalities in bovine embryos and their influence on development. *Biology of Reproduction*, 54:53-59.
- Keefe, D., Tran, P., Pellegrini, C., Oldenbourn, R. 1997.** Polarized light microscopy and digital image processing identify a multilaminar structure of hamster zona pellucida. *Human Reproduction*, 12:1250-1252.
- Kelly, J., Kleemann, D., Kuwayama, M., Walker, S. 2004.** Vitrification of *in vitro*-produced bovine and ovine embryos using the minimum volume cooling cryotop method. *Reproduction Fertility and Development*, 16:172-173.
- Keskintepe, L., Brackett, B. 2000.** Cryopreservation of bovine blastocysts obtained by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 53:1041-1052.
- Keskintepe, L., Brackett, B. 1996.** *In vitro* developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biology of Reproduction*, 55:333-339.
- Keskintepe, L., Burnley, C., Brackett, B., 1995.** Production of viable bovine blastocysts in defined *in vitro* conditions. *Biology of Reproduction*, 52:1410-1417.
- Khosla, S., Dean, W., Reik, W., Feil, R. 2001.** Epigenetic and experimental modifications in early mammalian development: Part II: culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype. *Human Reproduction Update*, 7:419-427.
- Khurana, N., Niemann, H. 2000.** Effect of oocytes quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocysts formation of bovine embryos. *Theriogenology*, 54:741-756.
- Kim, J., Kinoshita, M., Ohnishi, M., Fukui, Y. 2001.** Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and *in vitro*-matured bovine oocytes. *Reproduction*, 122:131-138.
- Kim, Y., Uhm, S., Gupta, M., Yang, J., Lim, J., Das, Z., Heo, Y., Chung, H., Kong, I., Kim, N., Lee, H., Ko, D. 2012.** Successful vitrification of bovine blastocysts on paper container. *Theriogenology*, 78:1085-1093.
- Kiyosu, C., Tsuji, T., Yamada, K., Kajita, S., Kunieda, T. 2012.** NPPC/NPR2 signaling is essential for oocyte meiotic arrest and cumulus oophorus formation during follicular development in the mouse ovary. *Reproduction*, 144:187-193.
- Ko, C., Ding, D., Chu, T., Chu, Y., Chen, I., Chen, W., Wu, G. 2008.** Changes to the spindle and zona pellucida of mature mouse oocytes following different cryopreservation methods. *Animal Reproduction Science*, 105:272-282.
- Kobayashi, K., Yamashita, S., Hoshi, H. 1994.** Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor on *in vitro* maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. *Reproduction*, 100:439-446.
- Kochhar, H., Kochhar, K., Basrur, P., King, W. 2003.** Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology*, 77:33-49.
- Kopf, G. 1990.** Zona pellucida-mediated signal transduction in mammalian spermatozoa. *Journal Reproduction and Fertility Supplement*, 42:33-49.
- Krisher, R. 2004.** The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*, 82:14-23.
- Krisher, R., Lane, M., Bavister, B. 1999.** Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biology of Reproduction*, 60:1345 [Abstract].
- Kuerschner, L., Moessinger, C., Thiele, C. 2008.** Imaging of lipid biosynthesis: How a neutral lipid enters lipid droplets. *Traffic*, 9:338-352.
- Kuran, M., Robinson, J., Brown, D., McEvoy, T. 2002.** Development, amino acid utilization and cell allocation in bovine embryo after *in vitro* production in contrasting culture system. *Reproduction*, 124:155-165.
- Kuran, M., Robinson, J., Staines, M., McEvoy, T. 2001.** Development and de novo protein synthetic activity of bovine embryos produced *in vitro* in different culture systems. *Theriogenology*, 55:593-606.
- Kuwayama, M., Vajta, G., Kato, O. 2005.** Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproduction Biomed Online*, 11:300-308.

Kuzmany, A., Havlicek, V., Wrenzycki, Ch., Wilkening, S., Brem, G., Besenfelder, U. 2011. Expression of mRNA, before and after freezing, in bovine blastocysts cultured under different conditions. *Theriogenology*, 75:482-494.

L

Landínez, J., Villamediana, P., Hernandez-Fonseca, H., Soto, E. 2010. Efecto del tiempo de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos sobre la progresión meiótica. Nota técnica. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 6:659-664.

Lane, M., Gardner, D. 2000. Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryo. *Biology of Reproduction*, 62:16-22.

Lane, M., Maybach, J., Hooper, K., Hasler, J., Gardner, D. 2003. Cryosurvival and development of bovine blastocysts are enhanced by culture with recombinant albumin and hyaluronan. *Molecular Reproduction and Development*, 64:70-78.

Lazar, A., Spak, J., Dávid, V. 2000. The vitrification of *in vitro* fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method. *Theriogenology*, 54: 571-578.

Lazzari, G., Wrenzycki, Ch., Herrmann, D., Duchi, R., Kruip, T, Niemann, H., Galli, C. 2002. Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the Large Offspring Syndrome. *Biology of Reproduction*, 67:767-775.

Lechniak, D., Pers-Kamczyc, E., Pawlak, P. 2008. Timing of the first zygotic cleavage as a marker of developmental potential of mammalian embryos. *Reproductive Biology*, 1:23-42.

Lee, D., Lee, J., Yoon, H., Lee, H., Kim, M., Roh, S. 1997. The supplementation of culture medium with protease improves the hatching rate of mouse embryos. *Human Reproduction*, 12:2493-2498.

Lee, E., Pugh, P., Allen, N., Fukui, Y., Thompson, J. 1998. [5-3H]-glucose and [1-14C]-pyruvate utilization by fresh and frozen-thawed Day 7 IVP bovine blastocysts cultured in PVA-or BSA-supplemented medium. *Theriogenology*, 49:233[Abstract].

Lee, H., Kim, S., Ji, D., Kim, Y. 2009. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm

quality and FIV results for cryopreserved bovine semen. *Journal Veterinary Science*, 10:249-255.

Leese, H. 2012. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction*, 143:417-427.

Lefebvre, R., Suarez, S. 1996. Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biology of Reproduction*, 54:575-582.

Leibfried-Rutledge, M., Northey, D., Monson, J., Rudledge, J. 1991. Hatching ability of *in vitro* produced cattle embryos is related to time of blastocoelic appearance in culture. *Theriogenology*, 35:325 [Abstract].

Leibo, P., Loskutoff, N. 1993. Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 39:81-94.

Leibo, S., Martino, A., Kobayashi, S., Pollard, J. 1996. Stage dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Animal Reproduction Science*, 42:45-53.

Leivas, F., Brum, D., Fialho, S., Saliba, W., Alvim, M., Bernardi, M., Rubin, M., Silva, C. 2011. Fetal calf serum enhances *in vitro* production of *Bos Taurus indicus* embryos. *Theriogenology*, 75:429-433.

Leroy, J., Genicot, G., Donnay, I., Van Soom, A. 2005. Evaluation of the Lipid Content in Bovine Oocytes and Embryos with Nile Red: a Practical Approach. *Reproduction in Domestic Animal*, 40:76-78.

Leroy, J., Van Hoeck, V., Clemente, M., Rizos, D., Gutiérrez-Adan, A., Van Soom, A., Uytterhoeven, M; Bols, P. 2010. The effect of nutritionally induced hyperlipidaemia on *in vitro* bovine embryo quality. *Human Reproduction*, 25:768-778.

Li, R., Wen, L., Wang, S., Bou, S. 2006. Development, freezability and amino acid consumption of bovine embryos cultured in synthetic fluid (SOF) medium containing amino acid at oviductal or uterine-fluid concentrations. *Theriogenology*, 66:404-414.

Liebermann, J., Tucker, M. 2002. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reproduction*, 124:483-489.

Lim, K., Jang, G., Ko, K., Lee, W., Park, H., Kim, J., Kang, S., Lee, S. 2008. Improved cryopreservation of bovine preimplantation embryos cultured in chemically defined

- medium. *Animal Reproduction Science*, 103:239-248.
- Lim, K., Jang, G., Ko, K., Lee, W., Park, H., Kim, J., Lee, S., Hwang, W., Lee, B., Kang, S. 2007.** Improved *in vitro* bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. *Theriogenology*, 67:293-302.
- Lima, P., Oliveira, M., Santos, M., Reichenbach, H., Weppert, M., Lópes, F., Neto, C., Goncalves, P. 2006.** Effect of retinoiDE and growth factor on *in vitro* bovine embryos produced unde chemically defined conditions. *Theriogenology*, 95:184-192.
- Listenberger, L., Han, X., Lewis, S., Cases, S., Farese, R., Ory, D., Schaffer, J. 2003.** Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*: 100: 3077-3082.
- Liu, L., Kong, N., Xia, G., Zhang, M. 2013.** Molecular control of oocyte meiotic arrest and resumption. *Reproduction, Fertility and Development*, 25: 463-471.
- Liu, L., Trimarchi, J., Keefe, D. 2002.** Haploidy but not parthenogenetic activation leads to increased incidence of apoptosis in mouse embryos. *Biology of Reproduction*, 66:204-210.
- Londos, C., Brasaemle, D., Schultz, C., Adler-Wailers, D., Levin, D., Kimmel, A. 1999.** On the control of lipolysis in adipocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 892:155-68.
- Lonergan, P. 2003.** Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction*, 68:236-243.
- Lonergan, P. 2006.** Influence of oocyte origin and embryo culture condition on gene expression and development outcome in cattle. *Journal of Reproductive and Development*, 52 (Suppl):S45-53.
- Lonergan, P., Carolan, C., Mermillod, P. 1994.** Development of bovine embryos *in vitro* folloing oocytes maturation under defined conditions. *Reproduction Nutritive Developmental*, 34:329-339.
- Lonergan, P., Fair, T. 2008.** *In vitro* produced bovine embryos-Dealing with the warts. *Theriogenology*, 69:17-22.
- Lonergan, P., Fair, T., Corcoran, D., Evans, A. 2006.** Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristic in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, 65:137-152.
- Lonergan, P., O’Kearney-Flynn, M., Boland, M. 1999.** Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medim under high or low oxygen tension. *Theriogenology*, 51:1565.
- Lonergan, P., Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Fair, T., Boland, M. 2003.** Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reproducyion in Domestic Animal*, 38:259-267.
- Lonergan, P., Rizos, D., Ward, F., Boland, M. 2001.** Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reproduction Nutrition Development*, 41:427-37.
- Looney, C., LinDEey, B., Gonseth, C., Johnson, D. 1994.** Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, 41:62-72.
- Luna, H., Ferrari, I., Rumpf, R. 2001.** Influence of stage of maturation of bovine oocytes at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II at completion of maturation. *Animal Reproduction Science*, 68:23-28.
- Luyet, B. 1937.** Tha vitrification of organic colloids and protoplasm. *Biodynamica*, 1:1-14.

M-N

- Macferlane, D. 1987.** Physical Aspects of Vitrification in Aqueous Solutions. *Cryobiology*, 24:181-195.
- Machaty, Z., Peippo, J., Peter, A. 2012.** Production and manipulation of bovine embryos: techiques and terminology. *Theriogenology*, 78:937-950.
- Magnusson, V., Feitosa, W., Goissis, M., Yamada, C., Tavares, L., Ortiz, M., Assumpção, D’Avila., Visintin, J. 2008.** Bovine oocyte vitrification: effect of ethylene glycol concentrations and meiotic stages. *Animal Reproduction Science* 106: 265-273.
- Mahmoudzadeh, A., Van Soom, A., Bols, P., Ysebaert, M., Kruif, A. 1995.** Optimization of a simple vitrification

- procedure for bovine embryos produced *in vitro*: effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. *Journal of Reproduction and Fertility*, 103:33-49.
- Makarevich, A., Chrenek, P., Olexikova, L., Popelkova, M., Turanova, Z., Ostro, A., Pivko, J. 2008.** Post-thaw survival, cell death and actin cytoskeleton in gene-microinjected rabbit embryos after vitrification. *Theriogenology*, 70:675-681.
- Makarevich, A., Kubovičová, E., Hegedušová, Z., Pivko, J., Louda, F. 2011.** Post-thaw culture in presence of insulin-like growth factor I improves the quality of cattle cryopreserved embryos. *Zygote*: page 1 of 6 C. Cambridge University Press 2011. doi:10.1017/S0967199410000675.
- Makarevich, A., Markkula, M. 2002.** Apoptosis and proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor-I during *in vitro* maturation and culture. *Biology of Reproduction*, 66:386-92.
- Mandelbaum, J. 2000.** Oocytes. *Human Reproduction*, 15: 11-18.
- Manikkam, M., Calder, M., Salfen, B., Youngquist, R., Keisler, D., Garverick, H. 2001.** Concentrations of steroid and expression of messenger RNA for steroidogenic enzymes and gonadotropin receptors in bovine ovarian follicles of first and second waves and changes in second wave follicles after pulsatile LH infusion. *Animal Reproduction Science*, 67:189-203.
- Manjo, G., Joris, I. 1995.** Apoptosis, oncosis, and necrosis. *American Journal of Pathology*, 146:3-15.
- Márquez, Y., López-Ortega, A., Galina, C. 2005.** Relación entre el tiempo de criopreservación y el grado de apoptosis en embriones bovinos. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*, 11:13-18.
- Martínez, A., Valcárcel, A., de las Heras, M., de Matos, D., Brogliatti, G. 2002.** Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos: *in vitro* and *in vivo* evaluations. *Animal reproduction Science*, 73:11-21.
- Martino, A., Mogas, T., Palomo, M., Paramio, M. 1995.** *In vitro* maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*, 43:473-485.
- Martino, A., Songsasen N., Leibo, S. 1996.** Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biology of Reproduction*, 54: 1059-1069.
- Martino, N., Dell'Aquila, M., Cardone, R., Somoskoi, B., Lacalandra, G., Cseh, S. 2013.** Vitrification preserves chromatin integrity, bioenergy potential and oxidative parameters in mouse embryos. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11:27 doi:10.1186/1477-7827-11-27.
- Martins, A., Bersano, J., Ogata, R., Amante, G., Nastari, B., Catroxo, M. 2013.** Diagnosis to Detect Porcine Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV) by Optical and Transmission Electron Microscopy Techniques. *International Journal of Morphology*, 31:706-715.
- Massip, A. 2003.** Cryopreservation of bovine oocytes: Current status and recent developments. *Reproduction Nutrition Development*, 43:325-330.
- Matsumura, K., Hyon, S. 2009.** Polyampholytes as low toxic efficient cryoprotective agents with antifreeze protein properties. *Biomaterials*, 30:4842-4849.
- Matsunari, H., Ikezawa, Y., Nakano, K., Ochiai, K., Hagiwara, Y., Sasayama, N., Yoshikawa, Y., Shirasu, A., Takahashi, M., Nagashima, H. 2010.** Cryopreservation of mouse embryos using a microfiltration membrane vitrification (MFMV) device. *Cryo The first International Congress on Controversies in cryopreservation of stem cell, reproductive cell. Tissue & Organs. Abstracts*. B3.
- Matwee, C., Betts, D., King, W. 2000.** Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote*, 8:57-68.
- Mavrides, A., Morroll, D. 2002.** Cryopreservation of bovine oocytes: is cryoloop vitrification the future to preserving the female gamete?. *Reproduction Nutrition Development*, 42:73-80.
- Mavrides, A., Morroll, D. 2005.** Bypassing the effect of zona pellucida changes on embryo formation following cryopreservation of bovine oocytes. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproduction Biology*, 118: 66-70.
- Meirelles, F., Caetano, A., Watanabe, Y., Ripamonte, P., Carambula, S., Merighe, G., García, S. 2004.** Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, 83:13-20.

- Men, H., Agca, Yuksel, Critser, E., Critser, J. 2005.** Beneficial effects of serum supplementation during *in vitro* production of porcine embryos on their ability to survive cryopreservation by open puled straws vitrification. *Theriogenology*, 64:1340-1349.
- Men, H., Monson, R., Parrish, J., Rutledge, J. 2003.** Degeneration of cryopreserved bovine oocyte via apoptosis during subsequent culture. *Cryobiology*, 47:73- 81.
- Men, H., Monson, R., Rutledge, J. 2002.** Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance. *Theriogenology*, 57: 1095-1103.
- Menezo, Y., Khatchadourian, C. 1991.** The laboratory culture media. *Assited Reproductive Review*, 6:136-143
- Merton, J., Knijn, H., Flapper, H., Dotinga, F., Roelen, B., Vos, P., Mullaart, E. 2013.** Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. *Theriogenology*, 80:365-371.
- Merton, J., Roos, A., Mullaart, E., Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P., Dieleman, S. 2003.** Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59:651-674.
- Mohr, L., Trounson, A. 1981.** Structural Changes Associated with Freezing of Bovine Embryos. *Biology of Reproduction*, 25:1009-1025.
- Mohr, L., Trounson, A. 1982.** Comparative ultrastructure of hatched human, mouse and bovine blastocysts. *Journal of Reproduction and Fertility*, 66:499-504.
- Momozawa, K., Fukuda, Y. 2011.** Establishment of an advanced chemically defined medium for early embryos derived from *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, 57:681-689.
- Moore, A., Squires, E., Graham, J. 2005.** Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, 51:241-249.
- Moore, K., Rodríguez-Sallaberry, C., Kramer, J., Johnson, S., Wroclawska, E., Goicoa, S., Niasari-Naslaji, A. 2007.** *In vitro* production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: Effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. *Theriogenology*, 68:1316-1325.
- Morató, R., Izquierdo, A., Paramio, M., Mogas, T. 2010.** Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of *in vitro*-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. *Reproduction, Fertility and Development*, 22:1141-1147.
- Morató, R., Mogas, T. 2014.** New device for the vitrification and in-straw warming of *in vitro* produce bovine embryos. *Cryobiology*, 68: 288-293.
- Mtango, N., Varisanga, M., Dong, Y., Rajamahendran, R., Suzuki, T. 2003.** Growth factors and growth hormone enhance *in vitro* embryos production and post-thaw survival of vitrified bovine blastocysts. *Theriogenology*, 59:1393-1402.
- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G., Hozbor, F., Alberio, R. 2006a.** Producción *in vitro* de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 38:97-104.
- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G., Hozbor, F., Cabodevila, J., Alberio, R. 2006b.** Effect of strous cow serum during bovine embryos culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, 65:1551-1562.
- Mukaida, T., Kasai, M. 2004.** In: *Cryobiology: Slow Freezing Vitrification of Embryos*. Gardner, K., Lane, M., Watson, A, eDE., A Laboratory Guide to the Mammalian Embryo, Chapter 24, p. 377. Oxford University Press.
- Murakami, M., Otoi, C., Sumantri, C., Suzuki, T. 1998.** Effect of centrifugation and lipid removal on the cryoprsvervation of *in vitro* produced bovine embryos at the eighth-cell stage. *Cryobiology*, 36:206-212.
- Nagai, T. 2001.** The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*, 55:291-1301.
- Nagano, M., Kang, S., Koyama, K., Huang, W., Yanagawa, Y., Takahashi, Y. 2013.** *In vitro* maturation system for individual culture of bovine oocytes using micro-volume multi-well plate. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 61:149-154.
- Nagao, Y., Ohta, Y., Murakami, H., Kato, Y. 2010.** The effects of methyl-beta-cyclodextrin on *in vitro* fertilization

and the subsequent development of bovine oocytes. *Zygote*, 18:323–330.

- Nakayama, T., Noda, Y., Goto, Y., Mori, T. 1994.** Effects of visible light and other environmental factors on the production of oxygen radicals by hamster embryos. *Theriogenology*, 41:499-510
- Nasr-Esfahani, M., Johnson, M. 1991.** The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured *in vitro*. *Development*, 113:551-560.
- Nedambale, T., Dinnyés, A., Groen, W., Dobrinsky, J., Tian, X., Yang, X. 2004.** Comparison on *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, 62:437-449.
- Nedambale, T., Du, F., Xu, J., Chaubal, S., Dinnyés, A., Groen, W., Faber, D., Dobrinsky, J., Yang, X., Tian, X. 2006a.** Prolonging bovine sperm-oocyte incubation in modified medium 199 improves embryos development rate and the viability of vitrified blastocysts. *Theriogenology*, 66:1951-1960.
- Nedambale, T., Du, F., Yang, X., Tian, X. 2006.** Higher survival rate of vitrified and thawed *in vitro* produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with β -mercaptoethanol. *Animal Reproduction Science*, 93:61-75.
- Neira, J., Tainturier, D., Peña, M., Martal, J. 2010.** Effect of association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF- β 1, GM-CSF and LIF on the development of bovine embryos produced *in vitro*. *Theriogenology*, 73:595-604.
- Neuber, E., Luetjens, C., Chan, A., Schatten, G., 2002.** Analysis of DNA fragmentation of *in vitro* cultured bovine blastocysts using TUNEL. *Theriogenology*, 57:2193-2202.
- Noda, Y., Matsumoto, H., Umaoka, Y., Umaoka, Y., Tatsumi, K., Kishi, J., Mori, T. 1991.** Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Molecular Reproduction and Development*, 28:356-360.
- Nuttinck, F., Charpigny, G., Mermillod, P., Loosfelt, H., Meduri, G., Freret, S., Grimard, B., Heyman, Y. 2004.** Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. *Domestic Animal Endocrinology*, 27:179-195.
- ## O-P
- O'Fallen, J., Wright, R. 1995.** Consumption of amino acids by bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*, 43:288 [Abstract].
- Ohboshi, S., Fujihara, N., Yoshida, T., Tomagane, H. 1998.** Ultrastructure of bovine *in vitro*-produced blastocysts cryopreserved by vitrification. *Zygote*, 6:17-26.
- Ohlweiler, L., Brum, D., Leivas, F., Moyses, A., Ramos, R., Klein, N., Mezzalira, J., Mezzalira, A. 2013.** Intracytoplasmic sperm injection improves *in vitro* embryo production from poor quality bovine oocytes. *Theriogenology*, 79:778-783.
- Olofsson, S., Boström, P., Andersson, L., Rutberg, M., Perman, J., Borén, J. 2009.** Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipiDE. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791:448-458.
- Orief, Y., Schultze-Mosgau, A., Dafopoulos, K., Al-Hasani, S. 2005.** Vitrification: will it replace the conventional gamete cryopreservation technique?. *Middle East Fertility Society Journal*, 10:171-184.
- Orsi, N., Leese, H. 2004.** Amino acid metabolism of preimplantation bovine embryos cultured with bovine serum albumin or polyvinyl alcohol. *Theriogenology*, 61:561-572.
- Ostrander, D., Sparagna, G., Amoscato, A., McMillin, J., Dowhan, W. 2001.** Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 276:38061-38067.
- Otoi, T., Yamamoto, K., Koyama, N., Suzuki, T. 1995.** *In vitro* Fertilization and Developmental of Immature and Mature Bovine Oocyte Cryopreserved by Ethylene Glycol with Sucrose. *Cryobiology*, 32:455-460.
- Otoi, T., Yamamoto, K., Koyama, N., Tachikawa, S., Murakami, M., Kikkawa, Y., Suzuki, T. 1997.** Cryopreservation of mature bovine oocytes following centrifugation treatment. *Cryobiology*, 34:36-41.
- Overstrom, E., Duby, R., Dobrinsky, J., Robl, J., Baguisi, A., Lonergan P. 1993.** Cytoskeletal damage in vitrified or

- frozenbovine embryos. *Theriogenology*, 39:276 [Abstract].
- Palasz, A., Mapletoft, J. 1996.** Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. *Biotechnologies Advances*, 14:127-149.
- Palma, G. 2001.** Producción *in vitro* de embriones bovinos. En *Biología de la Reproducción*. Ediciones del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, pp. 701.
- Palma, G., Müller, M., Brem, G. 1997.** Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 110:347-353.
- Pampfer, S. 2000.** Peri-implantation embryopathy induced by maternal diabetes. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 55:29-39.
- Park, S., Kim, E., Cui, X., Tae, J., Lee, W., Kim, N., Park, S., Lim, J. 2006.** Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. *Zygote*, 14:125-131.
- Park, Y., Kim, S., Park, H., Byun, M. 2005.** The effects of duration of *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. *Theriogenology*, 64:123-134.
- Parrish, J. 2014.** Bovine *in vitro* fertilization: *In vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*, 81:67-73.
- Parrish, J., Krogenaes, A., Susko-Parrish, J. 1995.** Effect of bovine sperm separation by swimup or percoll on success of *in vitro* fertilization and embryo development. *Theriogenology*, 44:859-69.
- Parrish, J., Susko-Parrish, J., Leibfried-Rutledge, M., Critser, F., Eyestone, W., First, N., 1986.** Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25:591-600.
- Partridge, R., Leese, H. 1996.** Consumption of amino acids by bovine preimplantation embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 8:945-950.
- Peláez-Gutiérrez, J., Urribarrí-Rodríguez, Pirela-Pirela, A., Báez, F., Villamediana, P., Hernández-Fonseca, H. 2012.** Influencia de la predominancia racial sobre la competencia de maduración, fecundación y desarrollo *in vitro* de ovocitos bovinos. *Revista de la Universidad del Zulia*, 5:21-42.
- Pereira, D., Alves, M., Rumpf, D., Rumpf, R. 2005.** Evaluation of different culture systems on the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, 63:1131-1141.
- Pereira, R., Baptista, M., Vasques, M., Horta, A., Portugal, P., Bessa, R., Chagas e Silva, J., Silva, M., Marques, C. 2007.** Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by cultura with *trans-10 cis-12* conjugated linoleic acid (*10t,12cCLA*). *Animal reproduction Science*, 98:293-301.
- Pereira, R., Marques, C. 2008.** Animal oocytes and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Banking*, 9:267-277
- Piecrce, B., Lewellyn, A., Parchment, R. 1989.** Mechanism of programmed cell death in the blastocyst. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:3654-3658.
- Pieterse, M., Vos, P., Kruij, T., Wurth, Y., Beneden, T., Willemse, A., Taverne, M. 1991.** Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, 35:401-413.
- Pinyopummintr, T., Bavister B. 1994.** Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology*, 41:1241-1249.
- Pinyopummintr, T., Bavister, B. 1991.** *In vitro*-matured/*in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morule/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biology of Reproduction*, 45:736-742.
- Pirestani, A., Morteza, S., Moulavi, F., Hajian, M., Fourozanfar, M., Nasr-Esfahani, M. 2011.** *In vitro* bovine embryo development with glucose and EDTA in different modifications of SOF medium. *International onference on Biology, Envirometal and Chemistry*, 24:283-287.
- Plachot, M. 2000.** Fertilization. *Human Reproduction*, 15:19-30.
- Plachot, M., Mamdelbaum, J., Junca, AM., Cohen, L. 1989.** Cytogenetic analysis and developmental capacity of normal and abnormal embryos after IVF. *Human Reproduction*, 4:99-103.
- Plante, L., King, W. 1994.** Light and electron microscopic analysis of bovine embryo derived by *in vitro* and *in vivo* fertilization.

- Journal of Assisted Reproduction & Genetic, 11:515-529.
- Plourde, D., Vigneault, Ch., Laflamme, I., Blondin, P., Robert, C. 2012a.** Cellular and molecular characterization of the impact of laboratory setup on bovine *in vitro* embryo production. *Theriogenology*, 77:1767-1778.
- Plourde, D., Vigneault, Ch., Lemay, A., Breton, L., Gagné, D., Laflamme, I., Blondin, P., Robert, C. 2012.** Contribution of oocyte source and culture conditions to phenotypic and transcriptomic variation in commercially produced bovine blastocysts. *Theriogenology*, 78:116-131.
- Poehland, R., Tomek, W., Becker, F., Kurth, J., Kanitz, W., Bhojwani, S. 2008.** Qualitative and quantitative differences of cytoskeleton proteins in embryos produced *in vitro*, *in vivo* and somatic nuclear transfer. *Molecular Reproduction and Development*, 75:1109-1119.
- Pollard, J., Leibo, S. 1994.** Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology*, 41:101-107
- Pomar, F., Ducro-Steeverink, D., Hazeleger, W., TeerDE, K., Colenbrander, B., Bevers, M. 2004.** Development DNA fragmentation and cell death in porcine embryos after 24 h storage under different conditions. *Theriogenology*, 61:147-158.
- Pomar, F., TeerDE, K., KiDEon, A., Colenbrander, B., Tharanit, T., Aguilar, B., Roelen, B. 2005.** Differences in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology*, 63:2254-2268.
- Ponter, A., Guyader-Joly, C., Nuttinck, F., Grimard, B., Humblot, P. 2012.** Oocyte and embryo production and quality after OPU-IVF in dairy heifers given diets varying in their n-6/n-3 fatty acid ratio. *Theriogenology*, 78:632-645.
- Pribenszky, C., Siqueira, E., Molnár, M., Ulrich, P., Barbosa, C., Hatamoto., Santos, C. 2005.** Pressure assisted cryopreservation: a novel possibility for IVP bovine blastocys cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 40:338 [Abstract].
- Pribenszky, C., Vajta, G., Molnár, M., Du, Y., Lin, L., Bolund, L., Yovich, J. 2010.** Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology. *Biology of Reproduction*, 83:690-697.
- Pryor, J., Looney, C., Rom, S., Kraemer, D., Long, C. 2011.** Cryopreservation of *in vitro* produced bovine embryos: effects of lipid segregation and post-thaw laser assisted hatching. *Theriogenology*, 75:24-33.
- Purdy, P., Graham, J. 2004.** Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility, *Biology of Reproduction* 71:522-527.

R

- Rall, W. 1992.** Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Animal Reproduction Science*, 28: 237-245.
- Rall, W., Fahy, G. 1985.** Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. *Nature*, 313:573-575.
- Rasmussen, S., Block, J., Seidel, G., Brink, Z., McSweeney, K., Farin, P., Bonilla, L., Hansen, P. 2013.** Pregnancy rates of lactating cows after transfer of *in vitro* produced embryos using X-sorted sperm. *Theriogenology*, 79:453-461.
- Razek, I., Charpigny, G., Kodja, S., Marquant, B. Mermillod, P., Guyader, C. 2000.** Differences in lipid composition between *in vivo* and *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology*, 53:346 [Abstract].
- Rieger, D., Loskutoff, N., Betteridge, K. 1992.** Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*, 4: 547-557.
- Rieger, D., Loskutoff, n., Betteridge, K. 1992a.** Developmentally related change in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured in intro. *Theriogenology*, 95:585-595.
- Rieger, D., Luciano, A., Modina, S., Pocar, P., Lauria, A., Gandolfi, F. 1998.** The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes *in vitro*. *Journal of Reproduction and Development*, 63:464-470.

- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. 2002a.** Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, 61:234-248.
- Rizos D., Clemente M., Bermejo-Álvarez, P., de la Fuente, J., Lonergan, P. and Gutiérrez-Adán, A. 2008.** Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. *Reproductive in Domestic Animal*, 43 (Supl. 4): 44-50.
- Rizos, D., Burke, L., Duffy, P., Wade, M., Mee, J., O'Farrell, K., MacSiurtain, M., Boland, M., Lonergan, P. 2005.** Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production *in vitro*. *Theriogenology*, 63:939-49.
- Rizos, D., Fair, T., Papadopoulos, S., Boland, M., Lonergan, P. 2002.** Developmental, qualitative and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, 62:320-327.
- Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Pérez-Garnelo, S., De la Fuente, J., Boland, M., Lonergan, P. 2003.** Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction*, 68:236-243.
- Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Pérez-Garnelo, S., De la Fuente, J., Boland, M., Rynkowska, A., Rapala, L., Trzeciak, P., Duszewka, A. 2011.** The application of *in vitro* cattle embryo production system to study the influence of elevated temperature on oocytes maturation, fertilization and early embryonic development. *Journal of Biotechnology*, 92:45-53.
- Rodríguez, K., Farin, C. 2004.** Developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes after transcriptional inhibition of germinal vesicle breakdown. *Theriogenology*, 61:1499-1511.
- Rodríguez-Martínez, H., Larsson, B., Perloft, H. 1997.** Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reproduction, Fertility and Development*, 9:297-308.
- Rodríguez, B., Molina, J., Villamediana, P. 2004.** Sobrevivencia morfológica y progresión meiótica de ovocitos bovinos vitrificados. *Ciencia*, 12: 125-136.
- Romek, M., Gajda, B., Krzysztofowicz, E., Smorag, Z. 2009.** Lipid content of non-cultured and cultured pig embryo. *Reproduction in Domestic Animal*, 44:24-32.
- Romek, M., Gajda, B., Krzysztofowicz, E., Smorag, Z. 2010.** Changes of lipid composition in non-cultured and cultured porcine embryos. *Theriogenology*, 74:265-276.
- Romek, M., Gajda, B., Rolka, M., Smorag, Z. 2011.** Mitochondrial activity and morphology in developing porcine oocytes and pre-implantation non-cultured and cultured embryos. *Reproduction in Domestic Animal*, 46:471-480.
- Russell, D., Robker, R. 2007.** Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Human Reproduction Update*, 13:289-312.
- Rynkowska, A., Rapala, L., Trzeciak, P., Duszewka, A. 2011.** The application of *in vitro* cattle embryo production system to study the influence of elevated temperature on oocyte maturation, fertilization and early embryonic development. *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, 92: 45-53.

S

- Sagirkaya, H., Misirlioglu, M., Kaya, A., First, N., Parrish, J., Memili, E. 2007.** Development potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Animal Reproduction Science*, 101:225-240.
- Saha, S., Rajamahendran, R., Boediono, A., Sumantri, C., Suzuki, T. 1996.** Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture *in vitro* following vitrification and one-step rehydration. *Theriogenology*, 46:331-343.
- Sakaguchi, M., Dominko, T., Yamauchi, N., Leibfried-Rutledge, M., Nagai, T., First, N. 2002.** Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors *in vitro*. *Reproduction*, 123:135-142.
- Sakkas, D., Shoukir, Y., Chardonnens, D., Bianchi, P., Campana, A. 1998.** Early cleavage of human embryos to the two-cell

- stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Human Reproduction*, 13:182-187.
- Salzano, A., Albero, G., Zullo, G., Neglia, G., Abdel-Wahab, A., Bifulco, G., Zicarelli, L., Gasparrini, B. 2014.** Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine *in vitro* produced embryos. *Animal Reproduction Science*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.018>
- Sanches, B., Marinho, L., Filho, B., Pontes, J., Basso, A., Meirinhos, M., Silva-Santos, K., Ferreira, C., Seneda, M. 2013.** Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. *Theriogenology*, 80:372-377.
- Santana, P., Carvalho, C., da Costa, N., Silva, T., Ramos, P., Cordeiro, M., Santos, S., Khayat, A., Ohashi, O., Miranda, M. 2014.** Effect of dexamethasone on development of *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 82:10-16.
- Saragusty, J., Arav, A. 2011.** Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, 141:1-9.
- Sasson, R., Rimon, E., Dantes, A., Cohen, T., Shinder, V., Land-Bracha, A., Amsterdam, A. 2004.** Gonadotropin-induced gene regulation in human granulosa cells obtained from IVF patients. Modulation of steroidogenic genes, cytoskeletal genes and genes coding for apoptotic signaling and protein kinases. *Molecular Human Reproduction*, 10:299-311.
- Sastre, D., da Costa, n., Alves de Sá, A., Braga, S., Chiaratti, M., Adona, P., Guemra, S., Vieira, F., do Socorro, S., Santos, D., Sena, L., Mitio, O., Melo dos Santos, E., dos Santos Miranda, M. 2014.** Expression of PLIN2 and PLIN3 during oocyte maturation and early embryo development in cattle. *Theriogenology*, 81:326-331.
- Sata, R., Tsuji, H., Abe, H., Yamashita, S., Hochi, H. 1999.** Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing medium during early embryonic development. *Journal of Reproduction and Development*, 45:97-103.
- Schneider, U.; Mazur, P. 1984.** Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology*, 21:68-79.
- Schoevers, E., Bever, M., Roelen, B., Colenbrander, 2005.** Nuclear and cytoplasmic maturation of sow oocytes are not synchronized by specific meiotic inhibition with resveratrol during *in vitro* maturation. *Theriogenology*, 63:1111-1130.
- Seidel, J. 2006.** Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*, 65:228-235.
- Serrano, C., Sierra, R., Sánchez, J., Restrepo, L., Olivera, M., 2002.** Evaluación de dos métodos de criopreservación sobre la calidad de embriones producidos *in vitro*. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 15:286-292.
- Shamsuddin, M., Rodríguez-Martínez, H. 1994.** Fine structure of bovine blastocysts developed either in serum-free medium or in conventional co-culture with oviduct epithelial cells. *Journal of Veterinary Medicine*, 41:307-316.
- Shaw, J., Oranratnachai, A., Trounson, A. 2000.** Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 53:59-72.
- Shibao, Y., Fujiwara, K., Kawasaki, Y., Matsumura, K., Hyon, S., Ito, J., Kashiwazaki, N. 2014.** The effect of a novel cryoprotective agent, carboxylated ϵ -poly-L-lysine, on the developmental ability of re-vitrified mouse embryos at the pronuclear stage. *Cryobiology*, 68:200-204.
- Shirazi, A., Nazari, H., Ahmadi, E., Heidari, B., Shams-Esfandabadi, N. 2009.** Effect of culture systems on survival rate of vitrified bovine embryos produced *in vitro*. *Cryobiology*, 59: 285-290.
- Shoukir, Y., Campana, A., Farley, T. 1997.** Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Human Reproduction*, 12:1531-1536.
- Silva, J., Hamel, M., Sahmi, M., Price, C. 2006.** Control of estradiol secretion and of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid accumulation by FSH involves different intracellular pathways in oestrogenic bovine granulosa cells *in vitro*. *Reproduction*, 132:909-917
- Silva, M., Berland, M. 2004.** Vitricación de blastocitos bovinos producidos *in vitro* con

- el método de open pulled straw (OPS): primer reporte. Arch. Med. Vet. XXXVI, N° 1.
- Siqueira, E., Caixeta, E., Pribenszky, C., Mohar, M., Hamos, A., Franco, M., Rumpf, R. 2011.** Vitrification of bovine pre-treated with sublethal hydrostatic pressure stress: evaluation of post-thaw *in vitro* development and gene expression. Fertility and Development, 23:585-590.
- Sirard, M. 2001.** Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. Theriogenology, 55:1241-1254.
- Sirard, M., Richard, F., Blondin, P., Robert, C. 2006.** Contribution of the oocyte to embryo quality, Theriogenology, 65:126-136.
- Sirisathien, S., Brackett, B. 2003b.** TUNEL analyses of bovine blastocysts after culture with EGF and IGF-I. Molecular Reproduction and Development, 65: 51-56.
- Sirisathien, S., Hernandez-Fonseca, H., Brackett, B. 2003a.** Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development *in vitro*. Theriogenology, 77:21-32.
- Skinner, J., Shew, T., Schwartz, D., Tzekov, A., Lepus, C., Abumrad, N. 2009.** Diacylglycerol enrichment of endoplasmic reticulum or lipid droplets recruits perilipin 3/TIP47 during lipid storage and mobilization. Journal of Biology and Chemistry, 284:30941-30948.
- Socorrano, L., Penzo, D., Petronilli, V., Pagano, F., Bernardi, P. 2001.** Arachidonic acid causes cell death through the mitochondrial permeability transition. Implications for tumor necrosis factor- α apoptotic signaling. Journal of Biological Chemistry, 276:12035-12040.
- Somgsasen, N., Yu, I., Ratterree, M., VanderVoort, C., Leibo, S. 2002.** Effect of chilling on the organization of tubulin and chromosomes in rhesus monkey oocytes. Fertility and Sterility, 4:818-825.
- Sosnowski, J., Switonski, M., Lechniak, Y., Molinski, K. 1996.** Cytogenetic evaluation on *in vitro* matured bovine oocytes collected from ovarian of individual donors. Theriogenology, 45:865-872.
- Spector, A. 1973.** Fatty acid, glyceride, and phospholipid metabolism. Growth Nutritive Metabolism Cells Culture, 1:257-296.
- Sprícigo, J., Morais, K., Ferreira, A., Machado, G., Gomes, A., Rumpf, R., Franco, M., Dode, M. 2014.** Vitrification of bovine oocytes at different meiotic stages using the Cryotop method: Assessment of morphological, molecular and functional patterns. Cryobiology, 69:256-265.
- Sprícigo, J., Morais, K., Yang, B., Dode, M. 2012.** Effect of the exposure to methyl- β -cyclodextrin prior to chilling or vitrification on the viability of bovine immature oocytes. Cryobiology, 65:319-325.
- Stainmiller, R., Moor, R. 1984.** Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of bovine oocyte matured outside of follicle. Gamet Research, 9: 221-229.
- Steel, R., Hasler, J.F. 2004.** Pregnancy rates resulting from transfer of fresh and frozen Holstein and Jersey embryos. Reproduction, Fertility and Development, 16:182-183 [Abstract].
- Stinshoff, H., Wilkening, S., Hanstedt, A., Brüning, K., Wrenzycki, C. 2011.** Cryopreservation affects the quality of *in vitro* produced bovine embryos at the molecular level. Theriogenology, 76:1433-1441.
- Sturmey, R., Leese, H. 2003.** Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. Reproduction, 126:197-204.
- Sudano, M., Martins, D., da Silva, T., Ferrari, I., Oña, L., Martins, A., Machado, R., da Cruz Landim, F. 2012a.** Crucial surviving aspects for vitrified *in vitro*-produced bovine embryos. Zygote, 22:124-131.
- Sudano, M., Paschoal, D., da Silva Rascado, T., Magalhães, L., Crocomo, L., Lima-Neto, J., Landim-Alvarenga, F. 2011.** Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. Theriogenology, 75:1211-1220.
- Sudano, M., Paschoal, D., Maziero, R., Rascado, T., Gustali, M., Crocomo, L., Magalhães, Monteiro, B., Martins, A., Machado, R., Landim-Alvarenga, F. 2013.** Improving postcryopreservation survival capacity: an embryo-focused approach. Animal Reproduction, 10:160-167.
- Sudano, M., Paschoal, D., Rascado, T., Macedo, C., Uliani, R., Landim-Alvarenga, F. 2008.** Effect of different concentration of fetal calf serum on

- production and quality of bovine embryo produced *in vitro*. *Acta Scientiae Veterinariae*, 36:495 [Abstract].
- Sudano, M., Santos, V., Tata, A., Ferreira, C., Paschoal, D., Machado, R., Buratini, J., Eberlin, M., Landim-Alvarenga, F. 2012.** Phosphatidilcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* *in vitro* and *in vivo*-produced blastocysts. *Biology of Reproduction*, 130:1-11.
- Sugimaya, S., McGowan, M., Kafi, M., Phillips, N., Young, M. 2003.** Effects of increased ambient temperature on the development of *in vitro* derived bovine zygotes. *Theriogenology*, 60:1039-1047.
- Sugimura, S., Akai, T., Hashiyada, Y., Somfai, T., Inaba, Y., Hirayama, M., Yamanouchi, T., Matsuda, H., Kobayashi, S., Aikawa, Y., Ohtake, M., Kobayashi, E., Konishi, K., Imai, K. 2012.** Promising system for selecting healthy *in vitro*-fertilized embryos in cattle. *PLoS ONE*, 7:e36627. doi:10.1371/journal.pone.0036627.
- Sumantri, C., Boediono, A., Ooe, M., Murakami, M., Saha, S., Suzuki, T. 1997.** The effect of sperm-oocyte incubation time on *in vitro* embryo development using sperm from a tetraparental chimeric bull. *Animal Reproduction Science*, 48:187-195.
- Sun, Q. 2013.** Regulating the orderly progression of oocyte meiotic maturation events in mammals. *Reproduction, Fertility and Development*, 25: iii-iv.
- Sutton-MacDowall, M., Gilchrist, R., Thompson, J. 2005.** Effect of hexoses and gonadotrophin supplementation on bovine oocyte nuclear maturation during *in vitro* maturation in a synthetic follicle fluid medium. *Reproduction Fertility and Development*, 17:407-415.
- Sutton-McDowall, M., Feil, D., Robker, R., Thompson, J., Dunning, K. 2012.** Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*, 77:1632-1641.
- Suzuki, M., Shinohara, Y., Ohsaki, Y., Fujimoto, T. 2011.** Lipid droplets: Size matters. *Journal of Electron Microscopy*, 60:S101-S116.
- Sz ell, A., Shelton, J., Sz ell, K. 1989.** Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. *Cryobiology*, 26:297-301.
- Takagi, M., Sakonju, I., Suzuki, T. 1996.** Effect of cryopreservation on DNA synthesis in the inner cell mass of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 58:1237-1238.
- Takahashi, T., Inaba, Y., Somfai, T., Kaneda, M., Geshi, M., Nagai, T., Manabe, N. 2013.** Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction Fertility and Development*, 25:589-599.
- Takahashi, Y., First, N. 1992.** *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 37:963-978.
- Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M., de Kruif, A. 2002.** Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 61:414-424.
- Tervit, H., Whittingham, D., Rowson, L. 1972.** Successful culture *in vitro* sheep and cattle ova. *Journal of Reproduction and Fertility*, 30:493-497.
- Thompson, J. 1996.** Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology*, 45:27-40.
- Thompson, J. 2000.** *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos a decade of achievement. *Animal Reproduction Science*, 61:263-275.
- Thompson, J., Gardner, D., Pugh, P., McMillan, W., Tervit, H. 1995.** Lamb birth weight is affected by culture system utilized during *in vitro* pre-elongation development of ovine embryos. *Biology of Reproduction*, 53:1385-1391.
- Tian, S., Yan, C., Yang, H., Zhou, G., Yang, Z., Zhu, S. 2007.** Vitrification solution containing DMSO and EG can induce parthenogenetic activation of *in vitro* matured ovine oocytes and decrease sperm penetration. *Animal Reproduction Science*, 101:365-371.
- Topper, E., Kruijt, L., Calvete, J., Mann, K., T opfer-Petersen, E., Woelders, H. 1997.** Identification of bovine zona

- pellucida. *Molecular Reproduction and Development*, 46:344-350.
- Tosti, E., Boni, R., Cuomo, A. 2000.** Ca²⁺ current activity decreases during meiotic pregression in bovine oocytes. *American Journal Physiology Cell*, 279:C1795-C1800.
- Trigal, B., Gómez, E., Caamaño, J., Muñoz, M., Moreno, J., Carrocera, S., Martín, D., Diez, C. 2012.** *In vitro* and *in vivo* quality of bovine embryos *in vitro* produced with sex-sorted sperm. *Theriogenology*, 78:1465-1475.
- Trigal, B., Gómez, E., Caamaño, J.N., Muñoz, M., Correia, E., Moreno, J., Carrocera, S., Martín, D., Diez, C. 2011.** Calves born from blastocysts produced *in vitro* with sexed sperm and transferred as fresh or after vitrification in *fibreplug*. AETE Meeting, Proceedings book pp. 234. Chester (UK), September 2011.
- Trigal, B., Gómez, E., Diez, C., Caamaño, J., Martín, D., Carrocera, S., Muñoz, M. 2011a.** *In vitro* development of bovine embryos cultured with activin A. *Theriogenology*, 75:584-588.
- Trounson A, Pushett, D., Maclellan, L., Lewis, I., Gardner, D. 1994.** Current status of IVM/IVF and embryos culture human and farm animals. *Theriogenology*, 41:57-66.
- Trounson, A. 1992.** The reproduction of ruminant embryos *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, 28:125-137.
- Tsujii, H., Khandoker, M., Hamano, K. 2001.** Lipid in mammalian embryo development. *Journal of Mammalian Ova Res*, 18:73-80.
- ## U-V
- Uhm, S., Gupta, M., Yang, J., Chung, H., Min, T., Lee, H. 2010.** Epidermal growth factor can be used in lieu of follicle-stimulating hormone for nuclear maturation of porcine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 73:1024-1036.
- Urdaneta, A. 2005.** Utilización de compuestos tiol en la producción *in vitro* de embriones a partir de cabras prepúberes. Universidad Autónoma de Barcelona, España. 213 p.
- Urman, B., Balaban, B., Alatas, C., Aksoy, S., Mumcu, A., Isiklar, A. 2002.** Zona-intact versus zona-free blastocyst transfer: a prospective, randomized study. *Fertility and Sterility*, 78:392-396.
- Urribarrí-Rodríguez, Y., Hernández-Fonseca, J., Villamediana, P., Mosquera, J., Pirela, A., Peláez, J., Hernández-Fonseca, H. 2012.** Estudio ultraestructural de embriones bovinos producidos *in vitro* durante las etapas de desarrollo temprano y tardío. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 3:201-210.
- Ushijima, H., Yamakawa, H., Nagashima, H. 1999.** Cryopreservation of bovine pre-morula stage *in vitro* matured/*in vitro* fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer. *Biology of Reproduction*, 60:534-539.
- Vajta, G. 2000.** Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animals Reproduction Science*, 60-61:357-364.
- Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P., Jacobsen, T., Greve, T., Callesen, H., Nagashima, H. 1998a.** Open pulled straw (OPS) vitrification; a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 51:53-58.
- Vajta, G., Hyttel, P., Callesen, H. 1997.** Morphological changes of *in-vitro*-produced bovine blastocysts after vitrification, in-straw direct rehydration, and culture. *Molecular Reproduction and Development*, 48:9-17.
- Vajta, G., Kuwayama, M. 2006.** Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65:236-244.
- Vajta, G., Kuwayama, M., Booth, P., Holm, P., Greve, T., Callesen, H. 1998b.** Open pulled straw vitrification of cattle oocytes. *Theriogenology*, 49:176 [Abstract].
- Vajta, G., Rindom, N., Peura, T., Holm, P., Greve, T., Callesen, H. 1999.** The effect of media, serum and temperature on *in vitro* survival of bovine blastocysts after Open Pulled Straw (OPS) vitrification. *Theriogenology*, 52:939-48.
- van der Ven, H., Isachenko, V., Isachenko, E., Montag, M., Nawroth, F. 2007.** Vitrification of pronuclear embryos: research basis for aseptic technology and its applications to oocytes and blastocysts. *Vitrification in Assisted Reproduction. A user's manual and trouble-shooting guide*. Edited by Michael J. Tucker and Juergen Liebermann. Chapter 8. Page: 163-182.
- Van Hoeck, V., Leroy, J., Arias, M., Rizos, D., Gutiérrez-Adan, A., Schnorbusch, K., Bols, P., Leese, H., Sturmey, R. 2013.**

- Oocyte developmental failure in response to elevated nonesterified fatty acid concentrations: Mechanistic insights. *Reproduction*, 145:33-44.
- Van Langendonck A, Donnay I, Schuurbiens N, Auquier P, Carolan C, Massip A. 1997.** Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. *Journal of Reproduction and Fertility*, 109:87-93.
- Van Soom, A., Mateusen, B., Leroy, J., De Kruif, A. 2003.** Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology?. *Reproductive BioMedicine Online*, 7:664-670.
- Van Soom, A., Yuan, Y., Peelman, L., Matos, D., Dewulf, J., Laevens, H., De Kruif, A. 2002.** Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. *Theriogenology*, 57:1453-1465.
- van Tol, H., van Eijk, M., Mummery, C., van der Hurk, R., Bevers, M. 1996.** Influence of FSH and hCG on the resumption of meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. *Molecular Reproduction and Development*, 45:218-224.
- Vandaele, L., Mateusen, B., Maes, D. De Kruif, A., Van Soom, A. 2006.** Is apoptosis in bovine *in vitro* produced embryos related to early developmental kinetics and *in vivo* bull fertility?. *Theriogenology*, 65:1691-1703.
- Vanderzwalmen, P., Bertin-Segal, G., Debauche, Ch., Standaert, V., Van Roosendaal, E., Vandervorst, M., Bollen, N., Zech, H., Mukaida, T., Takahashi, K., Schoysman, R. 2002.** Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Human Reproduction*, 17:744-51.
- Vanroose, G., Nauwynck, H., Van Soom, A., Ysebaert, M., Charlier, G., Oostveldt, P., Kruif, A. 2000.** Structural aspects of zona pellucida of *in vitro*-produced bovine embryos: A scanning electron and confocal laser scanning microscopy study. *Biology of Reproduction*, 62:463-469.
- Varisanga, M., Sumantri, C., Murakami, M., Fahrudin, M., Suzuki, T. 2002.** Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology*, 63:2147-2163.
- Velásquez, A., Manríquez, J., Castro, F., Rodríguez-Alvarez, L. 2013.** Effect of zona pellucida removal on early development of *in vitro* produced bovine embryos. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 45:7-15
- Verini, S., Monaci, M., Stradaiodi, G., Greve, T., Parrillo, F. 1996.** Identification of glycoconjugates in the zona pellucida of *in vitro* matured and tubal unfertilized bovine oocytes by lectin histochemistry. *Animal Reproduction Science*, 43:99-111.
- Vieira, A., Mezzalira, A., Barbieri, D., Lehmkuhl, R., Rubin, M., Vajta, G. 2002.** Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. *Cryobiology*, 45:91-94.
- Vila, L. 1984.** Principios químico-físicos de la criopreservación de material biológico. *Biology Clinic Hematology*, 6:227-236.
- Villamediana, P. 1998.** Embriones caprinos producidos *in vitro*: Estudio citogenético y ultraestructural de ovocitos madurados y fecundados *in vitro*. Universidad Autónoma de Barcelona, España. 172 p.
- Visintin, J., Martins, J., Bevilacqua, E., Mello, M., Nicácio, A., Assumpção, M. 2002.** Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: are they really different?. *Theriogenology*, 57:345-59.

W

- Wale, P., Gardner, D. 2010.** Time-lapse analysis of mouse embryo development in oxygen gradients. *Reproduction Biomedicine Online*, 21:402-410.
- Wale, P., Gardner, D. 2013.** Oxygen affects the ability of mouse blastocysts to regulate ammonium. *Biology of Reproduction*, 89:75 [Abstract].
- Walters, A., Saacke, R., Pearson, R., Gwazdauskas, F. 2005.** The incidence of apoptosis after IVF with morphologically abnormal bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 64:1404-1421.
- Walther, T., Farese, R. 2009.** The life of lipid droplets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791:459-466.
- Wang, A., Fu, Ch., Yu, S. 2013.** Green tea polyphenols added to IVM and IVC media affect transcript abundance, apoptosis, and

- pregnancy rates in bovine embryos. *Theriogenology*, 79:186-192.
- Wang, F., Tian, X., Zhang, L., He, C., Ji, P., Li, Y. 2014.** Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after *in vitro* fertilization. *Fertility and Sterility*, 101:577-586.
- Wang, F., Tian, X., Zhou, Y., Tan, D., Zhu, S., Dai, Y., Liu, G. 2014a.** Melatonin Improves the quality of *in vitro* produced (IVP) bovine embryos: implications for blastocyst development, cryotolerance, and modifications of relevant gene expression. *PLoS ONE* 9(4): e93641. doi:10.1371/journal.pone.0093641
- Wang, J., Chen, Q., Zhou, J., Wen, J., Bian, F., Li, G., Mu, X., Han, Y., Xia, G., Zhang, M. 2012.** Specific protein kinase C isoforms α and β I are involved in follicle-stimulating hormone-induced mouse follicle-enclosed oocytes meiotic resumption. *PLoS One* 7, e45043. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0045043.
- Wang, Q., Sun, Q. 2006.** Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. *Reproduction, Fertility and Development*, 19:1-12.
- Wang, W., Keefe, D. 2002.** Prediction of chromosome misalignment among *in vitro* human oocytes by spindle imaging with the polScope. *Fertility and Sterility*, 5:1077-1081.
- Wang, X., Catt, S., Pangestu, M., Temple-Smith, P. 2009.** Live offspring from vitrified blastocysts derived from fresh and cryopreserved ovarian tissue grafts of adult mice. *Reproduction*, 138:527-535.
- Wang, Z., Wang, W., Yu, S., Xu, Z. 2008.** Effects of different activation protocols on preimplantation development, apoptosis and ploidy of bovine parthenogenetic embryos. *Animal Reproduction Science*, 105:292-301.
- Wani, N., A. Maurya, S., N. Misra, A., K. Saxena, V., B. Lakhchaura, B., D. 2004.** Effect of cryoprotectants and their concentration on *in vitro* development of vitrified-warmed immature oocytes in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, 61:831-842.
- Ward, F., Enright, B., Rizos, D., Boland, M., Lonergan, P. 2002.** Optimization of *in vitro* bovine embryo production: Effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology*, 57:2105-2117.
- Ward, F., Lonergan, P., Enright, B., Boland, M. 2000.** Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovum pick-up technology. *Theriogenology*, 54:433-46.
- Warzych, E., Peippo, J., Szydlowski, M., Lechniak, D. 2007.** Supplements to *in vitro* maturation media effect the production of bovine blastocysts and their apoptotic index but not the proportions of matured and apoptotic oocytes. *Animal Reproduction Science*, 97:334-343.
- Watson, A., De Sousa, P., Caveney, A., Barcroft, L., Natale, D., Urquhart, J., Westhusin, M. 2000.** Impact of Bovine Oocyte Maturation Media on Oocyte Transcript Levels, Blastocyst Development, Cell Number, and Apoptosis. *Biology of Reproduction*, 62:355-364.
- Wei, Z., Park, K., Day, B., Prather, R. 2001.** Effect of epidermal growth factor on preimplantation development and its receptor expression in porcine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 60:457-462.
- Whittingham, D., Leibo, S., Mazur, P. 1972.** Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C . *Science*, 178:411-414.
- Wiemer, K., Watson, V., Polanski, A., McKenna, A., Fick, G., Schultz, G. 1991.** Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 30:330-338.
- WillaDEen, S., Polge, C., Rowson, L., Moor, R. 1974.** Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen. *Cryobiology*, 11:560[Abstract].
- Wilmut, I., Rowson, L. 1973.** Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. *Veterinary Record*, 92:686-690.
- Wit, A., Kruip, Th. 2001.** Bovine cumulus-oocytes-complex-quality is reflected in sensitivity for α -amanitin, oocyte-diameter and developmental capacity. *Theriogenology*, 65:51-65.
- Wrathall, A., Simmons, H., Van Soom, A. 2006.** Evaluation of risk of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilization with virus-infected semen. *Theriogenology*, 65:247-274.

- Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E, Niemann H. 2005.** Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development. *Reproduction, Fertility and Development*, 17:23–35.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Keskinetepe, L., Martins, Jr., Sirisathien, S., Brackett, B. 2001.** Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Human Reproduction*, 16:893-901.
- Webb, R., Marshall, F., Swann, K., Carroll, J. 2002.** Follicle stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in [cAMP] and protein kinase a in mammalian oocytes. *Developmental Biology*, 246, 441–454.

X-Y-Z

- Xu, Z., Garverick, H., Smith, G., Smith, M., Hamilton, S., Youngquist, R. 1995.** Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biology of Reproduction*, 53:951-957.
- Yadav, B., King, W., Betteridge, K. 1993.** Relationships between the completion of first cleavage and the chromosomal complement, sex, and developmental rates of bovine embryos generated *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, 36:434-439.
- Yang, B., Park, J., Yoo, H., Choi, H., Cheong, K., Kim, J., Park, Ch. 2012.** Cryopreservation of Embryo by Concentration of Ethylene Glycol and Day 6, 7, 8, 9 Embryo in Korean Native Cattle (Hanwoo). *Journal of Embryos Transfer*, <http://dx.doi.org/10.12750/JET.2012.27.4.253>
- Yang, H., Hwang, K., Kwon, H., Kim, H., Choi, K., Oh, K. 1998a.** Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Human Reproduction*, 13:998-1002.
- Yang, M., Rajamahendran, R. 2002.** Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, 70:159-169.
- Yang, X., Kubota, C., Taneja, M. 1998b.** Control of oocyte maturation in cows. *Biological factors. Theriogenology*, 49:471-482.
- Yavin, S., Arav, A. 2007.** Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology*, 67:81-89.
- Yu, X., Deng, W., Liu, F., Li, Y., Li, X., Zhang, Y., Zan, L. 2010.** Closed pulled straw vitrification of *in vitro*-produced and *in vivo*-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 73:474-479.
- Yuan, Y., Van Soom, J., Coopman, F., Mintiens, K., Boerjam, M., Van Zeveren, A., De Kruif, L., Peelman, L. 2003.** Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology*, 59:1585-1596.
- Yuan, Y., Van Soom, J., Leroy, J., Dewulf, A., De Kruif, L., Peelman, L. 2000.** Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*, 54:741-756.
- Zampieri, D., Santos, V., Braga, P., Ferreira, C., Ballottin, D., Tasic, L., Basso, A., Sanches, B., Pontes, J., Pereira da Silva, B., Garboggini, F. Eberlin, M., Tata, A. 2013.** Microorganisms in cryopreserved semen and culture media used in the *in vitro* production (IVP) of bovine embryos identified by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS). *Theriogenology*, 80:337-345.
- Zeron, Y., Ocheretny, A., Kedar, O., Borochoy, A., Sklan, D., Arav, A. 2001.** Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction*, 121:447-454.
- Zeron, Y., Tomczak, M., Crowe, J., Arav, A. 2002.** The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. *Cryobiology*, 45:143-152.
- Zhang, J., Nedambale, T., Yang, M., Li, J. 2009.** Improved development of ovine matured oocyte following solid surface vitrification (SSV): effect of cumulus cells and cytoskeleton stabilizer. *Animal Reproduction Science*, 110:26-55.

- Zijlstra, C., KiDEon, A., Schoevers, E., Daemen, A., Tharasanit, T., Kuijk, E., Hazeleger, W., Ducro-Steeverink, D., Colenbrander, B., Roelen, B. 2008.** Blastocyst morphology, actin cytoskeleton quality and chromosome content are correlated with embryo quality in the pig. *Theriogenology*, 70:923-935.
- Zuelke, K., Brackett, B. 1990.** Luteinizing hormones enhanced *in vitro* maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. *Biology of Reproduction*, 43:784-787.