



Universidad Nacional de Córdoba  
Facultad de Ciencias Agropecuarias (UNC)  
Escuela para Graduados

---

# **INFLUENCIA DE LA SUPLEMENTACION DEL MEDIO DE MADURACION Y DE CULTIVO EN LA SUPERVIVENCIA A LA CRIOPRESERVACION DE EMBRIONES BOVINOS IN VITRO**

**Beatriz Helena Bernal Ballesteros**

Tesis  
Para obtener el Grado Académico de  
Magíster en Reproducción Bovina

Universidad Nacional de Córdoba  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Escuela para Graduados

Instituto de Reproducción Animal Córdoba  
(IRAC)

**Córdoba, Septiembre 2016**

**INFLUENCIA DE LA SUPLEMENTACION DEL MEDIO DE  
MADURACION Y DE CULTIVO EN LA SUPERVIVENCIA A LA  
CRIOPRESERVACION DE EMBRIONES BOVINOS IN VITRO.**

Beatriz Helena Bernal Ballesteros

**Comisión Asesora de Tesis**

**Director:** M.V. (Ph.D.) Humberto Tribulo .....

**Co-Director:** BIO. (Ph.D.) Adrián Mutto .....

**Tribunal Examinador de Tesis** .....

.....

.....

**Presentación Formal Académica**

**Córdoba, Septiembre 2016**

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

**AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Humberto Tribulo por su orientación y apoyo, junto a los Drs. Ricardo Tribulo y Gabriel Bo por la beca otorgada para realizar esta maestría.

Al Dr. Adrián Mutto por su orientación y apoyo, a los integrantes de su equipo de trabajo.

A todos los integrantes de IRAC – BIOGEN que me acompañaron durante la consecución, transporte y punción de los ovarios.

Al equipo de Senasa y al personal del frigorífico Bustos & Beltrán, por la proporción de los ovarios.

A Esteban Domínguez por su ayuda en el préstamo del microscopio de fluorescencia.

Al equipo técnico y administrativo del laboratorio de Vitrogen Colombia, por su ayuda.

Y a todos los que aportaron en el desarrollo de esta tesis de una u otra forma.

A mi familia y amigos, a todos gracias.

*A mi familia, motor e inspiración.*

## RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue evaluar la influencia de la suplementación del medio de MIV y de CIV en la supervivencia a la criopreservación de embriones bovinos *In Vitro*. En el experimento 1, se evaluó el efecto de la adición de EGF en el medio MIV sobre la supervivencia a la congelación. Encontrándose que la adición de 50 ng/ml o 100 ng/ml, favoreció la maduración nuclear y no ejerció influencia sobre el desarrollo embrionario y la supervivencia de embriones congelados. En el experimento 2, se evaluó el efecto de la adición de Cisteamina en el medio de MIV sobre la supervivencia a la congelación. Observándose que la adición de 100  $\mu$ M favoreció la maduración nuclear y presentó una tendencia al aumento de embriones re – expandidos descongelados. En el experimento 3, se evaluó el efecto de la adición de 100  $\mu$ M de Cisteamina y de 100 ng/ml de EGF al medio MIV sobre la supervivencia a la congelación. Observándose que favoreció el desarrollo embrionario, pero no influyó en la supervivencia embrionaria. En el experimento 4, se evaluó el efecto en la supervivencia de embriones *In Vitro* por la adición de Cisteamina en el medio de CIV en d3 y d5, encontrándose que la adición de 100  $\mu$ M en d5 favoreció la producción de embriones y al suplementar con 50 o 100  $\mu$ M en este mismo día, se favoreció la eclosión a las 72 hs., pero no influyó en el número de blastómeras. En el experimento 5, se evaluó el efecto en la supervivencia de embriones *In Vitro* por la adición de ácido linoléico en el medio de CIV en d3 y d5. Observándose que suplementar con 50  $\mu$ M en d3, favoreció el clivaje y presentó una tendencia al aumento en el porcentaje de embriones y que la adición de 50  $\mu$ M en d5 favoreció la re-expansión de embriones descongelados. En el experimento 6, se evaluó el efecto en la supervivencia de embriones *In Vitro* por la adición de fosfatidilcolina de soja en el medio de cultivo en los días 3 y 5, encontrándose que no influyó. En el experimento 7, se evaluó el efecto de la adición de Ácido linoléico, Cisteamina y lecitina en el medio de cultivo en la supervivencia embrionaria a la congelación, encontrándose ningún efecto.

**Palabras claves:** Congelación, Cisteamina, EGF, Ácido linólico, Fosfatidilcolina de soja.

## **ABSTRACT**

The aim of this thesis was to evaluate the influence of supplementation IVM medium and CIV in cryopreservation survival of bovine embryos in vitro. In Experiment 1, the effect of the addition of EGF in the IVM medium on freezing survival finding that the addition of 50 ng/ml or 100 ng/ml, promotes nuclear maturation and no influence on embryo development and survival of frozen embryos. In experiment 2, the effect of adding Cysteamine in IVM medium was evaluated on survival frozen embryos, observed that the addition of 100  $\mu$ M promotes nuclear maturation and has a tendency to increase embryo re - expansion defrosted. In Experiment 3, the goal was study the effect of addition of cysteamine and EGF in IVM medium on frozen embryo survival and concluding that only embryo development improved and has no effect of embryo survival. In experiment 4, the goal was evaluate the in vitro embryo survival by the addition of cysteamine in IVC medium in d3 or d5, finding that the addition of 100 mM in d5 improved embryo production and with addition of 50 and 100 mM in the same day, improved hatching but has no influence in blastomeres numbers. In Experiment 5, the aim was study the effect of in vitro embryo survival by the addition of linoleic acid in IVC medium in d3 or d5, concluding that whit the supplementation with 50 mM in d3 stimulate cleaved embryos, presenting a tendence in embryo percentage and the addition of 50 mM in d5 favoreced re-expansion on frozen embryos. In Experiment 6, the effect on survival of embryos in vitro by addition of soy phosphatidylcholine in the culture medium on days 3 and 5 were evaluated and found to not influence. In Experiment 7, the effect of the addition of linoleic acid, Cysteamine and lecithin in the culture medium has no effect in frozen embryo survival.

**Keywords:** Freezing, Cysteamine, EGF, Linoleic Acid, Soybean Phosphatidylcholine.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
<b>Capítulo 1</b> .....	1
<b>INTRODUCCION</b> .....	1
Criopreservación .....	4
Radicales libres y estrés oxidativo .....	7
Factores de crecimiento o factores tróficos .....	10
Factor de crecimiento epidermal .....	11
Antioxidantes .....	12
Glutation .....	14
Cisteamina .....	15
Acidos grasos insaturados .....	16
Acido linoleico .....	17
Lecitina de soja .....	18
<b>HIPOTESIS</b> .....	19
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	20
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS</b> .....	20
<b>Capítulo 2</b> .....	22
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	22
Producción <i>in vitro</i> de embriones .....	22
Obtención y acondicionamiento de los ovarios .....	22
Recolección y selección de los COC's .....	22
Maduración <i>in vitro</i> .....	23
Fertilización <i>in vitro</i> .....	23
Manejo del semen .....	23
Manejo de los ovocitos .....	24
Cultivo embrionario <i>in vitro</i> .....	24
Criopreservación de los embriones obtenidos .....	25
Congelamiento .....	25
Descongelamiento .....	26
Experimento 1 .....	26
Experimento 2 .....	27
Experimento 3 .....	27
Experimento 4 .....	27
Experimento 5 .....	28
Experimento 6 .....	29
Experimento 7 .....	29
Análisis Estadístico .....	29
<b>Capítulo 3</b> .....	30
<b>RESULTADOS</b> .....	30
Experimento 1 .....	30

Experimento 2 .....	32
Experimento 3 .....	33
Experimento 4 .....	35
Experimento 5 .....	38
Experimento 6 .....	41
Experimento 7 .....	44
<b>Capítulo 4 .....</b>	<b>47</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>47</b>
<b>Capítulo 5 .....</b>	<b>58</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>58</b>
<b>Capítulo 6 .....</b>	<b>61</b>
<b>BIBLIOGRAFIA CITADA .....</b>	<b>61</b>



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 3.1.</b> Producción Embrionaria con adición de EGF al medio de MIV .....	30
<b>Tabla 3.2.</b> Extrusión de Primer Cuerpo Polar de ovocitos madurados con EGF .....	31
<b>Tabla 3.3.</b> Supervivencia de embriones congelados y tratados en MIV con EGF .....	31
<b>Tabla 3.4.</b> Producción de Embriones con adición de Cisteamina al medio MIV .....	32
<b>Tabla 3.5.</b> Extrusión Primer Cuerpo Polar de ovocitos madurados con Cisteamina ...	32
<b>Tabla 3.6.</b> Supervivencia de embriones congelados-tratados en MIV con Cisteamina.	33
<b>Tabla 3.7.</b> Producción de Embriones tratados con 100 $\mu$ M de Cisteamina y 100 ng/ml de EGF en el medio MIV .....	34
<b>Tabla 3.8.</b> Extrusión de Primer Cuerpo Polar de ovocitos madurados con 100 $\mu$ M de Cisteamina y 100 ng/ml de EGF.....	34
<b>Tabla 3.9.</b> Supervivencia de embriones congelados y tratados en MIV con EGF y Cisteamina .....	35
<b>Tabla 3.10.</b> Producción de Embriones obtenidos con la adición de Cisteamina en el medio CIV en d3 o d5 .....	35
<b>Tabla 3.11.</b> Número de células de embriones tratados con Cisteamina en el medio CIV en d3 o d5.....	37
<b>Tabla 3.12.</b> Producción de Embriones con adición de AL en el medio CIV.....	38
<b>Tabla 3.13.</b> Número de células de embriones tratados con AL.....	40

**Tabla 3.14.** Producción de Embriones con adición de Fosfatidilcolina de soja en el medio CIV en d3 o d5.....42

**Tabla 3.15.** Número de células de embriones tratados con Fosfatidilcolina de soja ...43

**Tabla 3.16.** Producción de Embriones con adición de Cisteamina, Ácido Linólico y Fosfatidilcolina de soja en el medio CIV en d3 o d5.....44

**Tabla 3.17.** Número de células de embriones tratados con Cisteamina, Ácido Linólico y Fosfatidilcolina de Soja en el medio de CIV ..... 46

## LISTA DE GRAFICOS

- Gráfico 3.1.** Diagrama de Box de re – expansión a las 24 hs. de embriones tratados con cisteamina en el medio CIV en d3 o d5.....36
- Gráfico 3.2.** Diagrama de Box de eclosión a las 72 hs. de embriones tratados con cisteamina en el medio CIV en d3 o d5.....37
- Gráfico 3.3.** Diagrama de Box de re – expansión a las 24 hs. de embriones tratados con Ácido linoléico en el medio CIV en d3 o d5.....39
- Gráfico 3.4.** Diagrama de Box de eclosión a las 72 hs. de embriones tratados con Ácido Linoléico en el medio CIV en d3 o d5.....40
- Gráfico 3.5.** Diagrama de Box de re – expansión a las 24 hs. de embriones tratados con Fosfatidilcolina de soja en el medio CIV en d3 o d5.....42
- Gráfico 3.6.** Diagrama de Box de eclosión a las 72 hs. de embriones tratados con Fosfatidilcolina de soja en el medio CIV en d3 o d5.....43

**Gráfico 3.7.** Diagrama de Box de re – expansión a las 24 hs. de embriones tratados con Cist. + AL + LS en el medio CIV en d3 o d5.....45

**Gráfico 3.7.** Diagrama de Box de eclosión a las 72 hs. de embriones tratados con Cist. + AL + LS en el medio CIV en d3 o d5.....45

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ACC .....	Acetil – CoA – carboxilasa.
ADN .....	Acido desoxirribonucleico.
AGPAT .....	1 – acilglicerol, 3 – fosfato o – aciltransferasa.
AL .....	Acido linoleico.
ALA .....	Acido $\alpha$ -linólenico.
BSA .....	Albúmina Sérica Bovina.
CLA .....	Acido Linóleico Conjugado.
CO <sub>2</sub> .....	Dióxido de Carbono.
CR <sub>2aa</sub> .....	Medio Charles Rosenkranz 2 con aminoácidos.
Da .....	Daltón.

D3	.....	día 3.
D5	.....	día 5.
D7	.....	día 7.
D8	.....	día 8.
FIV	.....	Fertilización In Vitro.
FSH – rh	.....	Hormona Folículo Estimulante – Recombinante Humana.
C <sup>13</sup>	.....	Carbono 13.
°C	.....	Grados centígrados.
CIV	.....	Cultivo In Vitro.
EG	.....	Etilenglicol.
EGF	.....	Factor de Crecimiento Epidermal.
ER	.....	Retículo Endoplasmático.
ERO	.....	Especies Reactivas de Oxígeno.
FAS	.....	Ácido graso sintetasa.
FSH – rh	.....	Hormona folículo estimulante – humano recombinante.
G6PDH	.....	glucosa – 6 – fosfato hidrogenasa.
GSH	.....	Glutation Reducido.
H	.....	Hora.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	.....	Peróxido de Hidrógeno.
ICM	.....	Masa Intracelular.
IETS	.....	Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones.
LS	.....	Lecitina de Soja.
MIV	.....	Maduración In Vitro.
MOET	.....	Multiovlación y transferencia de embriones.
nL/h	.....	nanolitros por hora.
Ng	.....	Nanogramos.

M .....	Molar.
Mg .....	Miligramos.
Min .....	minutos.
ml .....	mililitros.
$\mu\text{g}$ .....	Microgramos.
mM .....	milimolar.
m-RNA .....	Ácido Ribonucleico – mensajero.
$\mu\text{M}$ .....	Micromolar.
$\text{N}_2$ .....	Nitrógeno.
OPU .....	Aspiración Folicular transvaginal guiada por ultrasonografía.
$\text{O}_2$ .....	Oxígeno.
$\text{O}_2^-$ .....	Anión superóxido.
$\text{OH}^-$ .....	Radical Hidróxilo.
PBS m .....	Buffer fosfato salino – modificado.
PIVE .....	Producción In Vitro de Embriones.
PK – L .....	L – Piruvato quinasa.
rpm .....	Revoluciones por minuto.
S .....	Segundos.
SCF .....	Factor de crecimiento de células madre.
SFB .....	Suero Fetal Bovino.
SOF .....	Fluido sintético oviductal.
Spz .....	Espermatozoides.
TCM – 199 .....	Medio de cultivo tisular.
TE .....	Trofoctodermo.
v/v .....	Volumen a volumen.
w/v .....	Peso / volumen.

# CAPITULO 1

## INTRODUCCION

La producción de embriones bovinos *in vitro*, actualmente constituye una biotecnología animal utilizada para mejorar genéticamente las diferentes razas bovinas, permitiendo un aumento en el potencial productivo de las mismas y dando solución a los problemas de fertilidad de algunas donantes (Looney, 2009). Se ha constituido en una importante herramienta que se puede integrar con la metodología de múltiples ovulaciones y transferencia de embriones (MOET) debido a sus ventajas y flexibilidad (Galli, 2001; Havlicek, 2005; Looney, 2009; Mapletoft, 2013).

La técnica se basa en la extracción de los ovocitos de los ovarios bovinos mediante la aspiración folicular transvaginal guiada mediante ecografía (OPU: Ovum pick – up) o a partir de ovarios de frigorífico para fines comerciales o investigativos (Hasler, 1998; Pryor, 2000). Los ovocitos recuperados son madurados en medios específicos que son suplementados con hormonas en distintas concentraciones y suero, luego fertilizados y finalmente puestos en cultivo durante siete días, para finalmente ser transferidos en fresco o criopreservados (Hasler, 1995; Galli et al, 2001; Mucci, 2005; Chaubal et al, 2006; Looney, 2009).

Una de las mayores desventajas de la aplicación comercial de la técnica de Fertilización *in vitro*, se refiere a las bajas tasas de preñez obtenidas con los embriones criopreservados comparados con los obtenidos por MOET (Rizos et al, 2008; Zullo, 2015), esto se denota en los datos de transferencia de embriones del año 2014 (IETS, 2015).

En el año 2014 a nivel mundial se realizaron 94,666 colecciones *in vivo* y se transfirieron 614, 582 embriones (En fresco: 201,960 y congelados: 262,622); mientras que en *in vitro* se realizaron 129,098 aspiraciones y se transfirieron 364,727 (En fresco: 296,666 y congelados: 68,061). En Sur América se transfirieron 211,177 embriones en fresco y 40,096 congelados. Los embriones *in vitro* congelados sólo corresponden al 19% del total transferido a nivel mundial; siendo un porcentaje muy bajo, comparado con el 57% de embriones congelados, transferidos y obtenidos con la técnica de lavado convencional (262.622/877.086) (IETS, 2015).

Esta diferencia se debe a que los embriones producidos por la técnica de Fertilización *in vitro* son más sensibles a la criopreservación comparados a los *in vivo* (Hoschi, 1996; Rizos et al., 2003; Seidel, 2006; Assumpcao, 2008; Rizos et al, 2008).

Para que la técnica FIV sea ampliamente difundida es necesario que los embriones puedan ser criopreservados y almacenados en nitrógeno líquido (Khurana et al., 2000; Serapiao et al., 2005) y contar con protocolos eficientes para su transferencia directa (Sanches et al., 2016).

El embrión obtenido por FIV es muy sensible a la congelación, debido a las lesiones que presenta durante la etapa de congelado; ya que tienen un mayor contenido de lípidos, principalmente a nivel citoplasmático (Holm et al., 1998; Holm et al., 2002; Seidel, 2006; Pryor, 2007), siendo más oscuros y con menor densidad. Presentan una disminución en el número de blastómeras, una zona pelucida más frágil y una velocidad de desarrollo mayor (Abe, 2003). A nivel funcional, presentan anomalías en las uniones intercelulares, por la expresión anormal de las proteínas que conforman las uniones gap, acentuándose en la células trofoblásticas (Boni et al, 1999; Fair et al. 2001); así como también presentan alteraciones génicas, cromosómicas y metabólicas, al presentar una mayor concentración de triglicéridos (Iwasaki et al, 1990; Abe and



Otoi., 1999; Abe and Yamashita, 1999; Khurana et al., 2000; Fair et al., 2001; Rizos and Lonergan., 2002; Viuff et al, 2002; Corcoran et al, 2006., Lonergan et al., 2008; Zullo, 2015). También presentan una mayor incidencia de apoptosis (Rizos and Lonergan, 2002; Pomar et al, 2005).

Los anteriores factores afectan la supervivencia embrionaria de los embriones *in vitro*, es por este motivo que se debe mejorar la calidad de los blastocitos producidos mediante el mejoramiento en la formulación de los medios de cultivo (Ludwing, 1999) y en el desarrollo de protocolos adecuados de crioconservación, lo que permitiría una mayor supervivencia durante el proceso de congelación /descongelación (Seidel, 2006).

Una forma de mejorar los medios de producción es mediante la aplicación de aditivos, tales como:

- a. Factores de crecimiento, los cuales tienen efectos positivos en la tasa de maduración y en el desarrollo de pre – implantación, estimulando el metabolismo y crecimiento de los embriones (Lonergan, 1996; Gordon, 2003; Mtango, 2003; Hernández, 2004; Guo et al, 2009).
- b. Antioxidantes, reducen el daño celular al actuar como protectores reduciendo el efecto tóxico de la oxidación (Rocha et al, 2013). Glutación (GSH), albúmina sérica bovina (BSA), piruvato, ácido ascórbico, vitamina A, vitamina E, catalasa, compuestos azufrados, incluyendo taurina e hipotaurina, son frecuentemente usados como antioxidantes en los medios de cultivo (Hasler, 2010), ya que ayudan en el control de los procesos oxidativos de los procesos de producción *in vitro* (Reis, 2002) y por ende incrementan la criotolerancia.
- c. Ácidos grasos insaturados, los cuales incrementan la resistencia de los blastocitos en métodos de congelación convencional (Imai, 1997; Pereira, 2014).

La importancia de evaluar la viabilidad de la congelación de embriones bovinos producidos por FIV para su posterior transferencia por métodos directos, empleando etilenglicol (EG), se basa en que al contar con embriones congelados, estos se pueden transferir en el momento en que se disponga de vacas receptoras, independientemente de la época de producción. Esto significa una disminución de los costos al no tener que mantener receptoras ciclando y también facilita la programación de las transferencias, gestaciones y partos de las receptoras (Looney, 2009; Mapletotf, 2013).

Aunque existen diversos métodos de criopreservación, actualmente el más empleado es la vitrificación por sus resultados más estables en cuanto a tasas de preñez (Looney, 2009), para algunos veterinarios esta metodología no es tan sencilla de aplicar ya que requieren del protocolo de calentamiento o de un técnico de campo que realice dicho proceso, empleando mayor tiempo del que se requeriría si sólo se descongelara una pajuela como es el caso de los embriones congelados *in vivo*; además que la mayoría de medios de vitrificación requiere la remoción del crioprotector en etapas y se pueden presentar inconvenientes a la hora de transferir, debido a que el embrión puede tener un manejo no adecuado que influiría en su viabilidad (Larocca, 1998) y posteriormente en el porcentaje de preñez. El método de congelación de embriones bovinos *in vitro* con EG, permitiría un método de transferencia sencilla sin producir daño osmótico y con menor pérdida en la viabilidad embrionaria por su manipulación (Hasler, 2002).

## **CRIOPRESERVACION**

La criopreservación, es el proceso por el cual se congelan las células y tejidos a temperaturas muy bajas (por lo general entre -80 °C y -196 °C, esta última es el punto de ebullición del nitrógeno líquido), con el fin de mantener la viabilidad y la funcionalidad celular y la criobiología estudia los efectos de las bajas temperaturas sobre los sistemas celulares, enfatizando en las reacciones bioquímicas que son

determinadas por el “frío”, debido a que presenta efectos y/o variaciones en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas que pueden alterar las membranas celulares, orgánulos e interacción célula – célula (Ávila-Portillo, 2006; Woods, 2004).

La estructura y composición de las membranas plasmáticas determinan los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación, su comportamiento durante la congelación y descongelación definirá los índices de supervivencia (Ávila-Portillo, 2006). Los periodos críticos para la supervivencia celular dependen de la fase inicial del congelamiento y del periodo de retorno a condiciones fisiológicas (Mazur, 1984; Ávila-Portillo, 2006).

La membrana plasmática de la célula eucariota, independientemente de su composición, tiene una estructura organizada según el modelo de mosaico fluido, su composición básica consiste en lípidos anfipáticos, proteínas y un pequeño porcentaje de carbohidratos que varía según el tipo y especie celular (Mc Evoy et al, 2000; Ávila-Portillo, 2006). Los lípidos (colesterol y ácidos grasos) son los componentes de mayor proporción en la membrana plasmática, determinando la fluidez y resistencia de esta, durante los procesos de congelación (Zeron, 2001; Avila-Portillo, 2006). El empaquetamiento y la posición de estas moléculas en las bicapas determinan la rigidez de las membranas y por tanto el transporte de moléculas. Este transporte a través de las membranas es el punto crítico para la supervivencia celular post - descongelación (Zeron, 2001; Avilla-Portillo, 2006).

En los procesos de congelación, las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño por la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos, la transición de lípidos fluidos a sólidos se da a una temperatura de 10°C - 16°C, cambiando las funciones de la membrana y dándole un alto grado de fragilidad (Boiso, 2001). Durante la deshidratación celular que se da durante la congelación se pueden presentar pérdidas de lípidos, que afectarían la integridad de la membrana plasmática por la pérdida de la

capacidad de expansión durante la rehidratación al volver a condiciones isotónicas (Ávilla-Portillo, 2006). Durante la congelación por lo general se presenta lesión celular por la formación de hielo intracelular y por el estrés osmótico al que se ven sometidas las membranas celulares (Seidel, 2006); esto es relacionado con el efecto de la deshidratación producida durante la concentración de solutos y la muerte celular, con la vuelta a las condiciones isotónicas después de la congelación (choque osmótico); esto se basa en la reducción del volumen por el aumento de la osmolaridad extracelular, a medida que la célula pierde agua, la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo volumen, y al excederse la resistencia física de la membrana se producen cambios irreversibles en la permeabilidad, en este caso los crioprotectores por sus propiedades coligativas disminuyen la cantidad de hielo formado a cierta temperatura (Meryman, 1971; Boiso, 2001; Avila-Portillo, 2006).

El alto contenido de lípidos neutros, principalmente triglicéridos almacenados en las gotas citoplasmáticas presentes en las blastómeras de los embriones *in vitro*, asociado con una disminución en la concentración de ácidos grasos poli-insaturados en la membrana fosfolípida, son los factores causales de la baja crioresistencia (Bailey, 2014; Batista, 2014). Esta excesiva acumulación de lípidos neutros endógenos afecta el equilibrio de deshidratación y re-hidratación durante el congelado – descongelado del embrión (Rizos et al, 2003; Abe et al, 2004; Seidel, 2006).

Tanto los ovocitos como los embriones *in vitro* obtenidos de razas Bos Indicus y sus cruces presentan un mayor contenido y acumulación de lípidos neutros en el citoplasma con respecto a los de Bos Taurus, haciéndolos más sensibles a la congelación y disminuyendo su fertilidad (Ballard et al, 2008; Velásquez, 2011; Batista et al., 2014). El aumento de la composición de ácidos grasos en el complejo cúmulos – ovocito (COC's) disminuyen la competencia de desarrollo del ovocito (Adamiak et al, 2006; Velásquez, 2011).

El proceso de criopreservación da como resultado un aumento en el número de células apoptóticas (Pomar, 2005). Estos factores perjudiciales son ocasionados mayoritariamente por los radicales libres que se forman durante el congelamiento, siendo responsables de los daños oxidativos (Álvarez, 1993; Seidel, 2006; Saragusty, 2011). Motivo por el cual la criotolerancia se puede mejorar mediante el control de estos procesos oxidativos en los sistemas de Producción *in vitro* mediante la adición de aditivos.

## **RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO**

Los radicales libres son átomos o moléculas que contienen un electrón desapareado en el orbital externo, presentándose una alta inestabilidad química que les confiere una reactividad oxidante para otras especies químicas cercanas, con las cuales reaccionan de forma rápida. A nivel celular, las más importantes son las derivadas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (Gutiérrez, 2006).

Se forman como consecuencia de una reacción metabólica dentro de las células o de manera espontánea si las condiciones del medio lo permiten. Dentro de la célula existen muchos sitios de formación de especies reactivas ya sea del O<sub>2</sub> o del N<sub>2</sub>. La cadena respiratoria de las mitocondrias, es el principal sitio de producción de especies reactivas del oxígeno, seguido por los peroxisomas y el citosol. Los radicales libres derivados del nitrógeno, se producen en su mayoría en el citosol de la célula (Gutiérrez, 2006.).

Dentro del metabolismo oxidativo de las células, existen reacciones en las que participan las ERO, los cuales están involucrados en la síntesis de hormonas, proteínas, carbohidratos e incluso en la reacción de fusión del ovulo con el espermatozoide (Gutiérrez, 2006).

Las ERO en excesivas cantidades inducen a un estrés oxidativo, que exceden las defensas antioxidantes, con efectos tóxicos debido a la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, pudiendo producir daño oxidativo del ADN (Agnéz – Lima, 2011); además de alterar la función o estructura celular (Gutiérrez, 2006). Es así como el estrés oxidativo, es la perturbación del equilibrio entre pro – oxidantes y antioxidantes, en favor de los primeros, dando lugar a cambios en las biomoléculas y afectando su función (Kosower, 1983; Agarwal, 2005).

El daño celular producido por las especies ERO ocurre principalmente sobre macromoléculas, tales como:

1. Lípidos: Al presentarse la peroxidación lipídica, se afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, alterando la permeabilidad de la membrana celular, produciéndose edema y muerte celular (Cárdenas-Rodríguez, 2006). En la magnitud de la peroxidación lipídica, influyen los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la membrana celular y su accesibilidad, la tensión de oxígeno, el contenido celular de antioxidantes, entre otros (Guerin, 2001).
2. Proteínas: Presentándose oxidación de un grupo de aminoácidos, tales como: fenilalanina, tirosina, histidina y metionina. Se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas y formación de grupos carbonilo (Venerao Gutiérrez, 2002).
3. Ácido desoxirribonucleico (ADN): Manifestándose en mutaciones, pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes (Guérin et al., 2001, Venerao Gutiérrez, 2002, Agnez-Lima, 2011).

En la producción de embriones *in vitro* se observa bloqueo de desarrollo temprano, el cual ocurre durante el cuarto ciclo celular, en el paso de 8 a 16 células, correspondiente a la etapa del clivaje celular. Este bloqueo coincide con la activación completa del genoma embrionario (Meirelles, 2004; Memili, 2000; De Sousa, 1998 y Tarazona, 2010).

Los efectos negativos de las ERO están muy documentados en aspectos reproductivos, pero no hay mucha bibliografía sobre la contribución de los medios de cultivo en el estrés oxidativo de las gametas durante las técnicas de reproducción asistida (Martín – Romero, 2008). Medios de cultivo suministrados comercialmente generan ERO a varias velocidades, dependiendo de la composición, mientras que el líquido folicular las genera a un nivel mucho más bajo (Martín-Romero, 2008). Los tipos de ERO que se encuentran en los cultivos celulares son: anión superóxido ( $O_2^-$ ), Radical Hidroxilo (OH) y peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Guérin et al, 2001). La cantidad generada de cada tipo de ERO varía dependiendo del estado de desarrollo del embrión, ya que el metabolismo del  $O_2$  es muy importante (Thompson et al., 1996), siendo el promedio de la tasa de consumo de  $O_2$  por embrión de 2 nL/h (Guerin et al., 2001). Este consumo se ve afectado por factores ambientales y desordenes metabólicos embrionarios.

Hay una asociación entre la producción de ERO por el medio de cultivo y el consumo de contenidos tiólicos dentro de los ovocitos, lo que sugiere que la GSH intracelular se agota parcialmente durante la manipulación *in vitro* (Martín-Romero, 2008). El medio de cultivo puede dañar los ovocitos y en consecuencia el desarrollo del embrión en función de su composición (Martín-Romero, 2008), esto se debe a que el aumento del estrés oxidativo afecta la viabilidad de las células. Siendo las modificaciones oxidativas las responsables de la incompetencia de los ovocitos durante la maduración (Luciano, 2004).

## **FACTORES DE CRECIMIENTO O FACTORES TROFICOS**

Los factores de crecimiento son sustancias compuestas por un amplio grupo de moléculas polipeptídicas con peso molecular entre 1.000 y 40.000 Da. A nivel fisiológico actúan como reguladores intraováricos *in vivo*, están relacionados con la estimulación del crecimiento embrionario y fetal, durante el desarrollo y regulación de los procesos de proliferación y diferenciación celular y de tejidos; además de la estimulación de los procesos de reparación tisular (Heldin, 1989; Cornejo 2011).

A nivel folicular, la acción de las gonadotropinas es conducida por factores de crecimiento producidos localmente que actúan de forma autocrina y paracrina (Harper, 1993; Palomares-Naveda, 2004). Son expresados por los ovocitos y están involucrados en el control de la función celular de las células de los cúmulos (Harper, 1993; Kobayashi, 1994).

La calidad intrínseca de los ovocitos determina la calidad del embrión; pero las condiciones de cultivo durante la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos, puede influir significativamente sobre el desarrollo ovocitario, la tasa de fecundación *in vitro* y posterior desarrollo embrionario, es por esta razón que generalmente se adicionan factores tróficos (Palomares, 2004; Sirisathien, 2003, Lonergan, 2008.). La mayoría de los ovocitos se encuentran arrestados en Profase I, hasta el momento en que se produce la maduración. Este arresto es influenciado por factores que se encuentran en el fluido folicular, que interactúan entre el ovocito y las células de los cúmulos por medio de las uniones tipo gap (Sutton, 2003).



Los factores de crecimiento muestran efectos benéficos en el desarrollo de pre-implantación, estimulando el metabolismo y crecimiento de los embriones, aumentando la proliferación de las células que forman la masa intracelular (ICM) y del trofoctodermo (TE), activando los sistemas de transporte responsables de la captación de glucosa, mejorando la endocitosis e influyen en los procesos de replicación, traducción y degradación de proteínas (Goldman et al, 1993; Herler et al, 1998).

## **Factor de Crecimiento Epidermal**

El EGF es una molécula proteica que contiene 53 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 6045 Da, además posee 3 enlaces disulfuros en su configuración intramolecular, es codificado por un gen localizado en el cromosoma 4 (Harris, 2003; Cornejo, 2011). Sus principales acciones biológicas están relacionadas con la proliferación, regulación y diferenciación celular; al acelerar la progresión de la meiosis y formación de blastocitos (Sakaguchi, 2000; Grazul – Bilaska, 2003).

El EGF se ha encontrado en folículos preantrales y antrales pequeños de hámster, estimula la síntesis de ADN y la proliferación de células de la granulosa en bovinos y porcinos e inhibe su diferenciación; acorta el tiempo requerido para la ruptura de la vesícula germinal, promoviendo la reanudación de la meiosis (Harper, 1993). Incrementa la actividad de la enzima superóxido de dismutasa, enzima que actúa sobre el anión superóxido bloqueando al radical oxígeno, disminuyendo de esta forma la oxidación celular (Cornejo, 2011).

Las células del cúmulo y de la granulosa tienen receptores para EGF, el EGF intrafolicular puede actuar como un factor proliferante sobre las células de la granulosa (Palomares-Naveda, 2004). En diversos trabajos se ha sugerido su influencia positiva

sobra la tasa de división post-fecundación y el subsecuente desarrollo embrionario (Harper, 1993; Lonergan, 1996; Palomares-Naveda, 2004; Oyamada, 2004 b).

Medios de maduración de ovocitos suplementados con EGF, estimulan la expansión de los cúmulos y promueven la maduración nuclear *in vitro* de ovocitos bovinos rodeados por células de los cúmulos (Downs, 1989; Palomares, 2004), ejerce un efecto positivo en el número de células de blastocito (Lee and Fukui, 1995; Gordon, 2003).

Lonergan et al. (1996), reporta que la adición de EGF independientemente de la concentración a medios M – 199 estimulan la expansión de los cúmulos y aumenta significativamente la proporción de ovocitos que alcanzan metafase II y en concentraciones de 10 a 50 ng/ml, aumenta la proporción de embriones que llegan a blastocito. En Bovinos se ha utilizado en diferentes concentraciones y en general se ha obtenido los mejores resultados en concentración de 10 ng/ml (Grazul, 2003; Sirisathien, 2003).

Aunque la adición de factores de crecimiento y aminoácidos en medios de cultivo químicamente definidos mejora la producción de embriones bovinos, el aumento de los rendimientos de blastocitos puede no corresponder con un mayor desarrollo y mejora de la calidad de los mismos (Wrenzycki et. 2001).

## **ANTIOXIDANTES**

En condiciones de cultivo *in vitro*, se presentan modificaciones oxidativas de los componentes celulares por el aumento de ERO, que induce estrés en el cultivo (Deleuze, 2010).

Es normal que en la mitocondria celular, durante el proceso respiratorio se produzcan especies ERO; el aumento de ellos debido por lo general a una alta tensión de oxígeno durante el proceso PIVE, conlleva al fracaso del desarrollo embrionario (Rocha, et al. 2012).

Sistemas antioxidantes como el glutatión (GSH), atenúan los efectos negativos del estrés oxidativo por el barrido de ERO (Castillo, 2001). La adición de estos compuestos a los medios PIVE, reduce la formación de radicales libres, los más empleados son: Glutatión, BSA, piruvato de sodio, ácido ascórbico, catalasa, etc. (Hasler, JF., 2010).

La suplementación con antioxidantes es una estrategia interesante para mejorar la calidad del embrión, ya que reduce la muerte celular por estrés oxidativo (Rocha, et al., 2012) e incrementan los niveles de GSH mediante el aumento de la captación de cisteína (Deleuze, 2010).

Los medios de cultivo según su composición pueden contribuir en el estrés oxidativo de los gametos, ya que generan ERO a diversas velocidades, según la formulación, mientras que el líquido folicular los genera a una velocidad menor (Martín-Romero, 2008). La incubación de COC's en medios de cultivo muestra una mayor peroxidación lipídica comparado con los niveles encontrados en COC's recién recuperados (Martín – Romero, 2008), produciendo daño en la membrana del plasma. Esto puede ser disminuido al suplementar el medio con compuestos tiólicos.

Se presenta una asociación entre la producción de ERO debido al medio de cultivo y el consumo de compuestos tiólicos dentro de los ovocitos, lo que indica que el contenido intracelular de GSH se agota parcialmente durante la manipulación *in vitro* (Martín – Romero, 2008).

Rocha-Frigoni et al. (2014), reporta que la suplementación con antioxidantes durante la MIV y/o CIV reduce los niveles intracelulares de ERO y la tasa de apoptosis, sin embargo la suplementación no aumenta el desarrollo embrionario y la supervivencia después de vitrificación.

## **Glutation**

Es un tripéptido de carácter no vitamínico formado por los aminoácidos: ácido glutámico, glicina y cisteína, presente como GSH reducido en la totalidad de células y se presenta en concentraciones de mM (Kosower, 1983; Ríos, 2003). Sus funciones se establecen en dos categorías:

- a. Protectoras contra el estrés oxidativo (Martínez, 2006).
- b. De transporte y metabólicas (Martínez, 2006).

A nivel de protección participa en reacciones de transhidrogenación, intercambiando sus equivalentes reductores con otros tioles intracelulares, por lo cual se establece que su principal acción es el mantenimiento de estos en estado reducido (Ríos, 2003). Influye como donador de la capacidad reductora necesaria para la formación de desoxirribonucleótidos (Sistema de ribonucleótido reductasa) (Kosower, 1983).

El sistema formado por el glutatión y las enzimas que intervienen en el ciclo redox del glutatión forman el principal sistema de defensa a nivel intracelular frente a las

agresiones oxidativas, por lo cual actúan en el mantenimiento de la integridad de la membrana celular y en la regulación de la proliferación celular (Kosower, 1983; Dickinson, 2002; Martínez, 2006).

## **Cisteamina**

La cisteamina es un compuesto tiol, promotora de la síntesis del Glutati6n; se ha demostrado que su uso aumenta el contenido y síntesis de GSH intracelular mediante la captaci6n de cisteína y mejora el desarrollo del embri6n de las especies bovina, porcina y ovina, al ser suplementado en el medio de maduraci6n (Luciano, 2006; Deleuze, 2010). Adem6s brinda protecci6n a las c6lulas de los efectos nocivos causados por lesiones oxidativas (Guo, L, et al., 2009; Silva, 2010).

El mecanismo por el cual la cisteamina promueve la síntesis de GSH intracelular en los medios de cultivo se centra en su poder reductor de la cistina a cisteína. La biosíntesis de GSH depende de la disponibilidad de cisteína (Oyamada, 2004).

La adici6n de 100  $\mu$ M al medio MIV, contribuye con un aumento en el porcentaje de embriones que llegan a la etapa de blastocito, incrementando los niveles de GSH, sin influencia en las tasas de maduraci6n y con efecto en la calidad de los mismos. Adem6s de que su adici6n durante la producci6n de embriones bovinos en las etapas de maduraci6n y cultivo mejora la supervivencia del embri6n despu6s de la criopreservaci6n al presentar una mayor tasa de eclosi6n comparados con embriones sin este aditivo (De Matos et al., 1995; DG, Furnus, CC., et al., 1996).

Se reporta que suplementado en concentraciones de 12,5 a 500  $\mu\text{M}$  proporciona mayor desarrollo embrionario y en el rango de 100 a 150  $\mu\text{M}$  aporta en la calidad (Takashi et al., 1993; Caamaño et al., 1996).

## **ACIDOS GRASOS INSATURADOS**

Los fosfolípidos son moléculas de características anfipáticas que forman parte de las membranas celulares, favoreciendo las funciones biológicas en el crecimiento, maduración y funcionamiento de las células (Tamargo-Santos, 2011).

La inclusión en la dieta de ácidos grasos tipo n – 3 mejora la supervivencia embrionaria y la preñez. Además presentan efectos sobre la fluidez de la membrana celular y las propiedades biofísicas mejorando el desarrollo folicular, ovocitario y embrionario (Elaheh, 2013). Los ácidos grasos y el colesterol son esenciales en la síntesis de hormonas como: estrógenos, progesterona y prostaglandinas, influyendo en el desarrollo ovárico al incrementar el número o diámetro de los folículos (Piccinato, 2010; Elaheh, 2013).

Los lípidos que contienen ácidos grasos insaturados son susceptibles al estrés oxidativo, produciéndose la peroxidación lipídica, que ocasiona pérdida de fluidez y funciones de las membranas, inactivación de receptores y enzimas unidas a membranas, aumento de la permeabilidad iónica y ocasionalmente ruptura de membrana y muerte celular (Gutteridge, 1995).

El grado de insaturación de los ácidos grasos es el principal determinante de la temperatura de fusión de triglicéridos, como de la fluidez de membranas biológicas compuestas por fosfolípidos. Los ácidos grasos insaturados de cadena larga poseen funciones biológicas importantes como la de conferir flexibilidad y permeabilidad selectiva a las membranas celulares (Catalá, 2011).

Reportan que la adición de los ácidos grasos a los medios de cultivo *in vitro* bovinos favorece el aumento en el contenido de colesterol en las membranas de espermatozoides y ovocitos. Algunos estudios se han basado en la evaluación de ácidos grasos insaturados como aditivos pre-congelamiento, como lo es la adición de ácido linoléico a los medios de producción, observándose que mejora la resistencia de los blastocitos en métodos de congelación convencional (Imai et al, 1997).

El Ácido  $\alpha$  - linolenico (ALA) se ha encontrado en plasma y fluido folicular, estudios reportan que su suplementación al medio MIV de ovocitos bovinos incrementa la tasa de maduración, la producción, desarrollo y calidad de los blastocitos (Marei et. Al, 2009; Waleed et al., 2010).

## **Ácido linoleico**

Es un ácido graso poli-insaturado y esencial de la serie omega 6, cuya fórmula molecular es  $C_{18}H_{32}O_2$  . Es el ácido graso insaturado más abundante en el fluido folicular (Zeron, 2002) y se ha empleado como aditivo crioprotector en embriones bovinos con efectos favorables (Imai, 1997).

Los CLA (Ácido linoléico conjugado) son un grupo de isómeros del ácido linoléico, han demostrado actividad antilipogénica, especialmente el trans – 10, cis – 12 (Evans et al., 2002). Son potentes inhibidores de la glucólisis y la lipogénesis de novo, a través de la regulación de los genes glucosa – 6 – fosfato deshidrogenasa (G6PDH), L

– Piruvato quinasa (PK – L), ácido graso sintetasa (FAS) y acetil – CoA carboxilasa (ACC) (Dentin et al, 2005).

El ácido linoléico conjugado (CLA) se ha empleado en las dietas bovinas y en la suplementación de los medios de cultivo *in vitro* Bovino, para mejorar la supervivencia embrionaria ya que altera la composición lipídica de la membrana celular, inhibiendo la síntesis lipídica y regulando la expresión de genes que involucran la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos (Bailey, 2014). Algunos estudios con pre-neoplásicos, neoplásicos y células glandulares mamarias han demostrado que puede inducir apoptosis, tanto por la ruta del retículo endoplásmico (ER) como por la ruta mitocondrial debido a un incremento en los niveles de ERO y productos aldehídicos formados por el catabolismo de los ácidos grasos (Batista et al, 2014).

En estudios se reporta que el CLA adicionado al medio de CIV, junto con antioxidantes como el GSH y el  $\beta$  - mercaptoetanol, previene la oxidación de los ácidos grasos, disminuye el diámetro de las gotas lipídicas y la deposición citoplasmática de lípidos e incrementa la calidad de los blastocitos y la supervivencia de los embriones después de la criopreservación (Pereira et al., 2007; Pereira et al, 2008).

## **Lecitina de Soja**

Es un compuesto de fosfolípidos formado por fosfatidilcolina, fosfatidietanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol; además, presenta vitamina E, la cual le confiere propiedades antioxidantes al proteger a los ácidos grasos poli-insaturados, evitando su oxidación y la producción de radicales libres a nivel celular (Tamargo – Santos, 2011).



La lecitina de soja ha sido empleada con éxito en los medios de crioconservación espermática en especies bovinas (Aires, 2003), caprinas (Vidal et al. 2012), equinas (Papa et al., 2011), ovinas (Forouzanfar et al., 2010) y humana (Reed et al, 2009), como sustituto de la yema de huevo en términos de bioseguridad, sin presentar efectos citotóxicos (Bousseau et al., 1998).

No se ha establecido el mecanismo por el cual se protegen los espermatozoides durante la congelación – descongelación, pero se plantean dos posibles mecanismos (Vidal et al., 2012):

- a. Los fosfolípidos de la lecitina de soja pueden sustituir algunos de los fosfolípidos de la membrana del espermatozoide para mantener la estructura y función de la membrana plasmática.
- b. Los fosfolípidos de la lecitina de soja no entran en la membrana para alterar la concentración de fosfolípidos, sino que forman una película protectora alrededor de la célula para evitar la formación de hielo intracelular y para proteger la membrana del espermatozoide de daños mecánicos durante la congelación y descongelación.

Guyader – Joly et al (1999), demostró que hay una mejora en la tasa de eclosión de los embriones trabajados en medios de congelación suplementados con 0.1% w/v de fosfatidilcolina de soja, con respecto a los no suplementados.

## **HIPOTESIS**

**HI:** La supervivencia de los embriones congelados producidos *in vitro*, aumenta con la adición de EGF y cisteamina en el medio de maduración.

**III:** Un medio de cultivo secuencial suplementado con Cisteamina, Acido Linoleico y lecitina de soja, aumenta la supervivencia de los embriones congelados producidos *in vitro*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la influencia de la suplementación del medio de MIV y de CIV en la supervivencia a la criopreservación de embriones bovinos *in vitro*.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Evaluar el efecto de la adición de EGF en el medio de maduración de embriones bovinos *in vitro*, criopreservados mediante congelación lenta con EG (Experimento 1).
- Evaluar el efecto de la adición de Cisteamina en el medio de maduración de embriones bovinos *in vitro*, criopreservados mediante congelación lenta con EG (Experimento 2).
- Evaluar el efecto de la adición de Cisteamina y de EGF en el medio de maduración de embriones bovinos *in vitro*, criopreservados mediante congelación lenta con EG (Experimento 3).
- Evaluar el efecto en la supervivencia de embriones producidos *in vitro* por la adición de cisteamina en el medio de cultivo en los días 3 o 5 (Experimento 4).

- Evaluar el efecto en la supervivencia de embriones producidos *in vitro* por la adición de ácido linoleico en el medio de cultivo en los días 3 o 5 (Experimento 5).
- Evaluar el efecto en la supervivencia de embriones producidos *in vitro* por la adición de fosfatidilcolina de soja en el medio de cultivo en los días 3 o 5 (Experimento 6).
- Evaluar el efecto de la adición de Ácido linoleico, Cisteamina y lecitina en el medio de cultivo de embriones bovinos *in vitro*, criopreservados mediante congelación lenta con EG (Experimento 7).

## **CAPITULO 2**

### **MATERIALES Y METODOS**

#### **PRODUCCION *IN VITRO* DE EMBRIONES**

#### **OBTENCION Y ACONDICIONAMIENTO DE LOS OVARIOS**

Los ovarios fueron obtenidos de vacas faenadas otorgados por el Frigorífico Bustos & Beltrán, ubicado en Juarez Celmán - provincia de Córdoba. Los ovarios fueron transportados en un recipiente térmico conteniendo PBS modificado (Pyctor, PBSm) a una temperatura de 25 a 35 °C, hasta las instalaciones del Laboratorio de PIVE de Biogen Argentina SA, ubicado en General Paz – camino Paraje del Tigre – Provincia de Córdoba. Luego fueron lavados con agua tibia y PBSm, posteriormente colocados en baño termostático cubiertos de PBSm para su posterior procesamiento.

#### **RECOLECCION Y SELECCIÓN DE LOS COMPLEJOS OVOCITOS – CELULAS DE LOS CUMULOS (COC´s)**

Los complejos COC's se obtuvieron de la punción de folículos de 2 a 13 mm de diámetro empleando jeringas Agtech de 5 ml con agujas de calibre 19 G. El fluido folicular obtenido se colocó en tubos Falcon de 50 ml. El fluido folicular se dejó reposando hasta visualización del pellet formado por los COC's que decantaron, estos se extraen con pipeta pasteur y se coloca en placa de 90 mm (Delta Lab), para la búsqueda de los mismos con ayuda de lupa estereoscópica. Los COC's seleccionados fueron los grados I, II y III (Hasler et al., 1995), estos fueron lavados en tres gotas de 100 µl de medio TCM – 199 Hank's (Gibco, Alemania) suplementado con 2, 5 mg/ml de piruvato de sodio (Sigma, E.U.A.), 50 µg/ml de gentamicina (Sigma, E.U.A.) y 10% de SFB (Gibco, Alemania), el cual fue atemperado previamente a 38.8 C y luego en una gota de 100 µl de medio MIV (TCM – 199 Earl's (Gibco, Alemania) suplementado con 10 µl/ml de FSH – rh (Gonal-f, Merck, E.U.A.), 2,5 mg/ml de piruvato de sodio, 50 µg/ml de gentamicina y 1 % de SFB), equilibrado a 38.8 C con una atmósfera de 5.5% CO<sub>2</sub>.

## **MADURACION IN VITRO**

Los COC's obtenidos fueron cultivados en placas de Petri de 35 mm (Corning®) por la metodología de microgota con un volumen de 90 µl de medio MIV y cubiertas con aceite mineral (Sigma, E.U.A.), en grupos de máximo 20 por gota, equilibrado a 38,8 °C y con una atmósfera de 5.5 % de CO<sub>2</sub>. El tiempo de maduración fue de 24 h.

## **FERTILIZACION IN VITRO**

## **MANEJO DEL SEMEN**

Para la fertilización de los ovocitos se empleó semen convencional de toros con fertilidad comprobada.

Las pajuelas de 0.5 ml, se descongelaron 10 segundos al aire y 30 s en baño maría a 37 C. Para su selección y capacitación se empleó el sistema de gradientes de minipercoll de densidad creciente (45% - 90% v/v) previamente atemperada a 38.8 C. El contenido de la pajuela se colocó en la parte superior del gradiente y se realizó una centrifugación a 4000 rpm durante 8 min., el pellet resultante se resuspendió en 1 ml de IVF – SOF, previamente equilibrado a 38.8 C y atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5.5 % y se procedió a una segunda centrifugación a 1200 rpm durante 5 min.

Posteriormente se realizó el conteo de espermatozoides (Spz) en cámara de Neubauer para determinar la concentración espermática, mediante una dilución en agua de 1/20. Establecida la concentración se procedió a fertilizar los ovocitos con una dosis de  $1.5 \times 10^6$  spz/ml.

## **MANEJO DE LOS OVOCITOS**

Pasadas 24 h de maduración, los COC's fueron lavados en tres gotas de 100 µl de IVF – SOF con 50 µg/ml de heparina (Sigma, E.U.A.) y depositados en placas de cultivo de 35 mm (Corning ®) con microgotas de un volumen de 50 µl de IVF – SOF y cubiertas con aceite mineral. La co-incubación de los espermatozoides con los COC's fue de 18 – 24 h a 38.8 C y 5.5% de CO<sub>2</sub>.

## **CULTIVO EMBRIONARIO IN VITRO**

Pasadas las 18 – 24 h del proceso FIV, se procedió a denudar mecánicamente los presuntos cigotos con micropipeta p100 y se lavaron en cuatro gotas de 100 µl de medio SOF – Citrato, sin suplementación con SFB, previamente equilibrado a 38.8 C y con atmósfera de 5.5 % CO<sub>2</sub> y 7% O<sub>2</sub>.

Las estructuras denudadas se colocaron en placas de cultivo de 35 mm con gotas de 90 µl de medio SOF – Citrato cubiertas con aceite mineral, de acuerdo a los experimentos se realizaba feeding (cambio del 50% de medio) con el medio correspondiente en los días 3 o 5.

El análisis de clivaje se realiza el día 3, visualizando por medio de lupa estereoscópica la presencia de dos o más células. El análisis de producción embrionaria se realizó el día 7 del cultivo por observación de la cantidad de blastocitos.

## **CRIOPRESERVACION DE LOS EMBRIONES OBTENIDOS**

### **CONGELAMIENTO**

Los blastocitos grado I, día 7 del CIV se lavaron en tres gotas de 100 µl de SOF – Citrato para retirar el aceite proveniente de las placas de cultivo, luego se expusieron durante 5 minutos en Etilenglicol 1.5 M (Vigro Ethylene Glycol, Bioniche Animal Health, Pullma, E.U.A.), se cargaron 10 embriones por pajuela de 0.25. Las pajuelas cargadas y selladas se pusieron en una congeladora Freeze Control 5500 (Cryologic ®, Australia) a – 6.5 °C, después de 2 min se realizó el seeding (inducción de la cristalización), luego de 10 minutos de estabilización se inició la curva de

congelamiento a una velocidad de 0.6 °C /min, al culminar la curva de congelamiento, es decir a los – 35 °C, las pajuelas se almacenaron en un termo con N<sub>2</sub> líquido por un tiempo mínimo de una semana.

## **DESCONGELAMIENTO**

Para evaluar la resistencia de los embriones a la criopreservación, se tomaron las pajuelas almacenadas en N<sub>2</sub> líquido y se descongelaron, sacudiéndolas 10 s al aire y 20 s en baño maría a 37 C y se depositaron en una placa de Petri, para luego ser lavados con SOF – Citrato y puestos en CIV en este mismo medio mediante la técnica de microgota, para evaluar a las 24, 48 y 72 h, la re-expansión y eclosión de los embriones cultivados nuevamente.

## **EXPERIMENTO 1**

Evaluación del efecto de la adición de 50 ng/ml y 100 ng/ml de Factor de Crecimiento Epidermal (E9644, Sigma. E.U.A.) en el medio de MIV, en el porcentaje de ovocitos en metafase II (% de CPI), en el desarrollo embrionario (% clivaje: estructuras con división celular en d3 y % de embriones en d7) y en la supervivencia de blastocitos (evaluación de embriones re – expandidos y eclosionados) criopreservados mediante congelación lenta con EG. El grupo control no presenta adición de EGF.



A las 24 h de la MIV, se evaluó la maduración ovocitaria mediante la observación de la expansión de las células de los cúmulos y por la presencia del primer corpúsculo polar (CPI) en el espacio perivitelino; para ello fue realizado el denudamiento de los COC's en 1 mg/ml de Hialuronidasa (Sigma, E.U.A) en TCM – 199 Hank's atemperado a 38.8 C, mediante pipeteo mecánico.

Se pusieron a madurar los ovocitos necesarios para obtener un n aproximado de 100 embriones congelables (Solo grado I), este parámetro fue igual para todos los tratamientos de los distintos experimentos.

## **EXPERIMENTO 2**

Evaluación del efecto de la adición de 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M de Cisteamina (M 9768, Sigma, E.U.A.) en el medio MIV, en el porcentaje de ovocitos en metafase II, en el desarrollo embrionario y en la supervivencia de blastocitos criopreservados mediante congelación. El grupo control no presenta adición de Cisteamina. Se evaluó la maduración ovocitaria, clivaje, producción de blastocitos y supervivencia a la congelación, mediante la misma metodología explicada en el experimento 1.

## **EXPERIMENTO 3**

Evaluación del efecto de la adición de 100 ng/ ml de EGF y 100  $\mu$ M de Cisteamina en el medio de maduración, en el porcentaje de oocitos en metafase II, en el desarrollo embrionario y en la supervivencia de blastocitos criopreservados mediante congelación lenta con EG, empleando la misma metodología empleada en el experimento 1. El grupo control no presenta adición de estos aditivos.

## **EXPERIMENTO 4**

Evaluación del efecto de la adición de 100  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  de Cisteamina en el medio de cultivo los días 3 o 5, en la producción de embriones, número de blastómeras y en la supervivencia a la congelación.

Grupo control: Adición de Cisteamina 100  $\mu\text{M}$  y EGF 100 ng/ml, en el medio MIV y sin adición de aditivos en el medio CIV.

El número de blastómeras por embrión de cada uno de los tratamientos y para los experimentos posteriores, se calculó mediante la siguiente metodología: los blastocitos día 8 de CIV se lavan en 400  $\mu\text{l}$  de PBSm, se fijan con una solución de paraformaldehído (Merck, Alemania) al 4% durante 30 min., luego se tiñen con 400  $\mu\text{l}$  de la solución del colorante vital Hoechst 33342 (Sigma, E.U.A.) (Bis – Binzimida: 5  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 10 min. Los embriones fijados y teñidos se colocan en portaobjetos para ser visualizados en microscopio invertido de fluorescencia con aumento de 40X. Las imágenes fueron tomadas con una cámara Olympus BX 50 CAMEDIA y el software CAMEDIA C – 7070 - 64 bit. Con las fotos individuales se realizó el conteo celular mediante el programa Image J (National Institutes of Health).

## **EXPERIMENTO 5**

Evaluación del efecto de la adición de 50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  de Ácido Linoleico (L1012, Sigma. E.U.A.) en el medio de CIV los días 3 o 5, en la producción de embriones, número de blastómeras y en la supervivencia a la congelación.

Grupo control: Adición de Cisteamina 100  $\mu$ M y EGF 100 ng/ml, en el medio MIV y sin adición de aditivos en el medio CIV.

## **EXPERIMENTO 6**

Evaluación del efecto de la adición de 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M de L -  $\alpha$  - Fosfatidilcolina de soja (P7443, SIGMA, E.U.A.) en el medio de CIV los días 3 o 5, en la producción de embriones, número de blastómeras y en la supervivencia a la congelación.

Grupo control: Adición de Cisteamina 100  $\mu$ M y EGF 100 ng/ml, en el medio MIV y sin adición de aditivos en el medio CIV.

## **EXPERIMENTOS 7**

Evaluación del efecto de la adición de 50  $\mu$ M de Ácido linoleico, 100  $\mu$ M de Cisteamina y 100  $\mu$ M de fosfatidilcolina de soja en el medio de CIV el día 5, en la producción de embriones, número de blastómeras y en la resistencia tras congelación.

Grupo control: Adición de Cisteamina 100  $\mu$ M y EGF 100 ng/ml, en el medio MIV y sin adición de aditivos en el medio CIV.

## **ANALISIS ESTADISTICO**

Los datos obtenidos fueron normalizados por la raíz cuadrada y analizados por el test de rango múltiple de Duncan, teniendo como diferencia significativa un  $p < 0.05$ . Se empleó el software Stata MP – 64.

### RESULTADOS

#### EXPERIMENTO 1

En este experimento se evaluó el efecto de la adición de EGF en el medio de maduración de embriones bovinos *in vitro*, criopreservados mediante congelación lenta con EG.

**Tabla 3.1.** Producción Embrionaria con adición de EGF al medio de MIV.

GRUPO	OVOCITOS (n)	CLIVAJE (%)	EMBRIONES (%)
CONTROL	424	74,8 ± 9,9	30,7 ± 3,5
EGF 100	371	81,6 ± 12,2	30,9 ± 15,9
EGF 50	315	68,5 ± 11,3	33,8 ± 10,9

Los porcentajes no difieren significativamente ( $P > 0,05$ ).

La adición de EGF en el medio de maduración en las concentraciones propuestas, no ejerció efecto sobre el desarrollo embrionario.

**Tabla 3.2.** Extrusión de Primer Cuerpo Polar de ovocitos madurados con EGF.

<b>GRUPO</b>	<b>OVOCITOS (n)</b>	<b>CPI (%)</b>
<b>CONTROL</b>	293	75,3 ± 4,3 <sup>a</sup>
<b>EGF 100</b>	311	86,3 ± 4,9 <sup>b</sup>
<b>EGF 50</b>	307	81,4 ± 4,2 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> Porcentajes en la misma columna con diferente superíndice, indica diferencia significativa ( $P < 0,05$ ).

La suplementación con EGF tiene un efecto positivo en la extrusión del primer cuerpo polar en las concentraciones propuestas. ( $P < 0,02$ ).

**Tabla 3.3.** Supervivencia de embriones congelados y tratados en MIV con EGF.

<b>GRUPO</b>	<b>EMBRIONES (n)</b>	<b>RE – EXP (%)</b>	<b>ECLOSION (%)</b>
<b>CONTROL</b>	122	43,9 ± 16,9	16,8 ± 14,1
<b>EGF 100</b>	120	55,8 ± 20,4	27,5 ± 28,2
<b>EGF 50</b>	112	46,1 ± 15,8	16,5 ± 13,2

Los porcentajes no difieren significativamente ( $P > 0,05$ ).

La adición de EGF al medio de MIV no afecta la supervivencia embrionaria a la congelación, con respecto al control ( $P > 0,2$ ).

## EXPERIMENTO 2

En este experimento se evaluó el efecto de la adición de Cisteamina en el medio de maduración de embriones bovinos *in vitro*, criopreservados mediante congelación lenta con EG.

**Tabla 3.4.** Producción de Embriones con adición de Cisteamina al medio MIV.

GRUPO	OVOCITOS (n)	CLIVAJE (%)	EMBRIONES (%)
CONTROL	480	66,8 ± 5,2	26,8 ± 10,0
CISTEAMINA 100	424	68,8 ± 4,1	32,0 ± 9,5
CISTEAMINA 50	433	70,9 ± 5,9	31,4 ± 14,2

Los porcentajes no difieren significativamente ( $P > 0,05$ ).

La adición de Cisteamina en el medio de maduración en las concentraciones propuestas, no presenta influencia sobre el desarrollo celular y embrionario.

**Tabla 3.5.** Extrusión de Primer Cuerpo Polar de ovocitos madurados con Cisteamina.

GRUPO	OVOCITOS (n)	CPI (%)
CONTROL	253	72,3 ± 3,8 <sup>a</sup>
CISTEAMINA 100	268	80,0 ± 6,5 <sup>b</sup>
CISTEAMINA 50	243	75,4 ± 8,0 <sup>a</sup>

<sup>ab</sup> Porcentajes en la misma columna con diferente superíndice, indica diferencia significativa ( $P < 0,05$ ).

Con 100  $\mu\text{M}$ , se observó un aumento en el porcentaje de ovocitos en metafase II ( $P = 0,032$ ).

**Tabla 3.6.** Supervivencia de embriones congelados y tratados en MIV con Cisteamina.

GRUPO	EMBRIONES (n)	RE – EXP (%)	ECLOSION (%)
CONTROL	135	53,9 $\pm$ 8,4	18,1 $\pm$ 14,0
CISTEAMINA 100	140	63,3 $\pm$ 9,5	23,7 $\pm$ 9,4
CISTEAMINA 50	136	53,4 $\pm$ 8,4	23,2 $\pm$ 5,9

Los porcentajes no difieren significativamente ( $P > 0,05$ ).

En concentración de 100  $\mu\text{M}$  se presentó una tendencia al aumento de embriones re – expandidos ( $P = 0,08$ ), aunque no influyó en el porcentaje de embriones eclosionados.

### EXPERIMENTO 3

En este experimento se evaluó el efecto de la adición de Cisteamina y de EGF en el medio de maduración de embriones bovinos *in vitro*, criopreservados mediante congelación lenta con EG. En el experimento 1 se observa que la mejor concentración de EGF corresponde a 100 ng/ml. Entre tanto la mejor concentración del experimento 2 es 100  $\mu\text{M}$ , por este motivo se decide evaluar la adición de estos dos aditivos en el medio MIV.



**Tabla 3.7.** Producción de Embriones tratados con 100  $\mu$ M de Cisteamina y 100 ng/ml de EGF en el medio MIV.

<b>GRUPO</b>	<b>OVOCITOS (n)</b>	<b>CLIVAJE (%)</b>	<b>EMBRIONES (%)</b>
<b>CONTROL</b>	408	52,0 $\pm$ 6,6 <sup>a</sup>	23,8 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>
<b>EGF + CIST.</b>	358	69,5 $\pm$ 7,1 <sup>b</sup>	32,1 $\pm$ 4,0 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> Porcentajes en la misma columna con diferente superíndice, indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

La adición de estos dos componentes en el medio MIV, favoreció el desarrollo embrionario con respecto al control ( $P$  clivaje = 0,001 y  $P$  emb. = 0,001).

**Tabla 3.8.** Extrusión de Primer Cuerpo Polar de ovocitos madurados con 100  $\mu$ M de Cisteamina y 100 ng/ml de EGF.

<b>GRUPO</b>	<b>OVOCITOS (n)</b>	<b>CPI (%)</b>
<b>CONTROL</b>	410	72,1 $\pm$ 6,7 <sup>a</sup>
<b>EGF + CIST.</b>	410	81,3 $\pm$ 6,7 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> Porcentajes en la misma columna con diferente superíndice, indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

La adición de Cisteamina y EGF, en las concentraciones propuestas favoreció la maduración nuclear de los ovocitos ( $P = 0,02$ ).

**Tabla 3.9.** Supervivencia de embriones congelados y tratados en MIV con EGF y Cisteamina.

GRUPO	EMBRIONES (n)	RE – EXP (%)	ECLOSION (%)
CONTROL	98	58,7 ± 14,8	27,7 ± 6,5
EGF + CIST.	115	60,4 ± 12,2	34,3 ± 6,9

Los porcentajes no difieren significativamente ( $P > 0,05$ ).

La adición de un factor de crecimiento (EGF) y de un antioxidante de origen tiol (Cisteamina) al medio MIV, no afecta la supervivencia embrionaria luego de congelación.

## EXPERIMENTO 4

En este experimento se evaluó el efecto en la supervivencia de embriones producidos *in vitro* por la adición de cisteamina en el medio de cultivo en d3 o d5.

**Tabla 3.10.** Producción de Embriones obtenidos con la adición de Cisteamina en el medio CIV en d3 o d5.

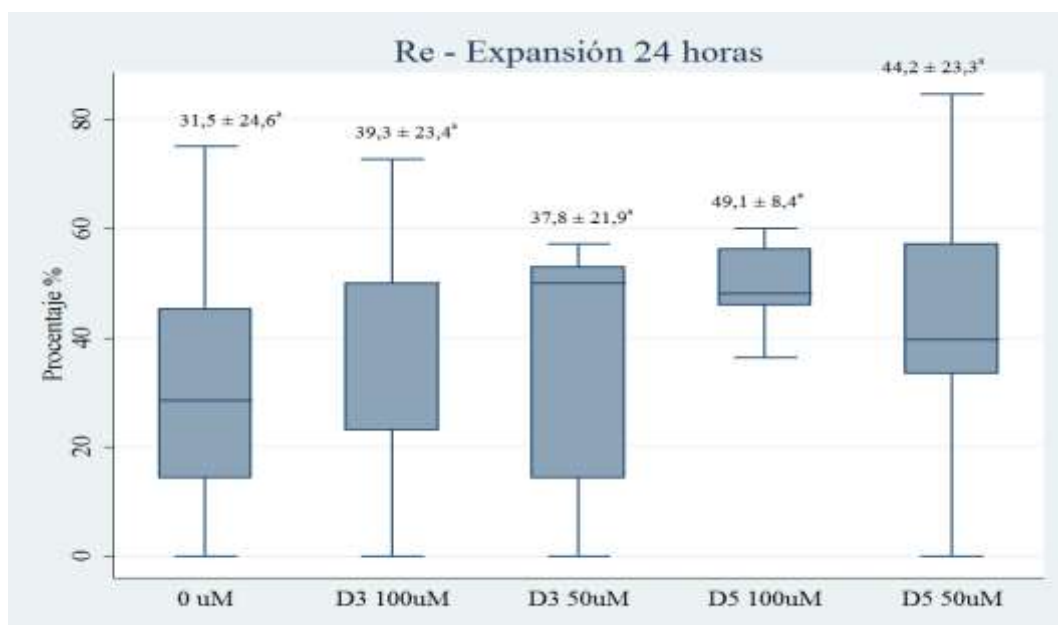
GRUPO	OOCITOS (n)	CLIVAJE (%)	EMBRIONES (%)
CONTROL	365	58,9 ± 16,9 <sup>a</sup>	32,5 ± 15,7 <sup>a</sup>
D3 CISTEAMINA 100	513	63,1 ± 14,6 <sup>a</sup>	21,3 ± 10,1 <sup>a</sup>
CISTEAMINA 50	515	63,2 ± 17,3 <sup>a</sup>	22,3 ± 11,4 <sup>a</sup>

<b>D5</b>	<b>CISTEAMINA 100</b>	189	71,0 ± 9,2 <sup>a</sup>	58,8 ± 8,4 <sup>ab</sup>
	<b>CISTEAMINA 50</b>	345	61,2 ± 8,6 <sup>a</sup>	33,8 ± 12,8 <sup>a</sup>

<sup>ab</sup> Porcentajes en la misma columna con diferente superíndice, indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

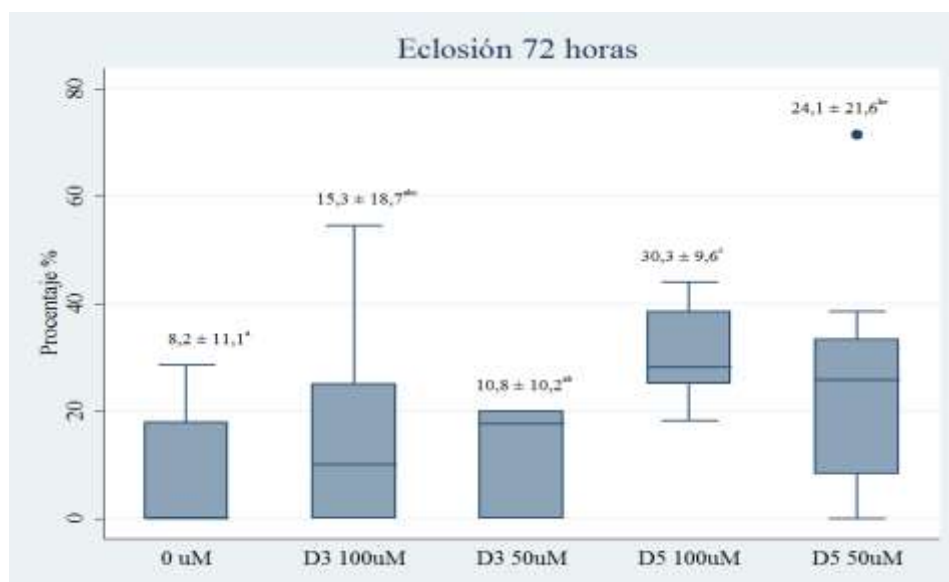
La adición de Cisteamina en el medio de CIV no influye sobre el porcentaje de clivaje. Mientras que la producción embrionaria es afectada al adicionarse en el d3, observándose una tendencia a la disminución en la cantidad de blastocitos tanto en la concentración de 100  $\mu\text{M}$  ( $P = 0,06$ ) como en la de 50  $\mu\text{M}$  ( $P = 0,1$ ). Al suplementar con 100  $\mu\text{M}$  ( $P = 0,001$ ) en el día 5 del CIV, se observa un efecto positivo en la producción de blastocitos.

**Gráfico 3.1.** Diagrama de Box de re – expansión a las 24 hs. de embriones tratados con cisteamina en el medio CIV en d3 o d5.



Los porcentajes no difieren significativamente ( $P > 0,05$ ).

**Gráfico 3.2.** Diagrama de Box de eclosión a las 72 hs. de embriones tratados con cisteamina en el medio CIV en d3 o d5.



abc Porcentajes con diferente superíndice indican tendencia y diferencia significativa ( $p < 0.1$ ).

La adición de Cisteamina en los días y concentraciones propuestas no influye en la re-expansión a las 24 hs. de los embriones descongelados, pero si favorece la eclosión (evaluada hasta las 72 hs) al ser adicionada en el d5 tanto en la concentración de 50  $\mu\text{M}$  ( $P = 0,04$ ) como en la de 100  $\mu\text{M}$  ( $P = 0,01$ ).

**Tabla 3.11.** Número de células de embriones tratados con Cisteamina en el medio CIV en d3 o d5.

GRUPO	EMB ( n )	No. TOTAL CEL.
CONTROL	15	159,9 ± 34,2
D3 CIST. 100	15	159,2 ± 30,9
50	15	156,9 ± 23,5
D5 CIST. 100	15	161,1 ± 23,8

50	15	160,0 ± 32,4
----	----	--------------

Los porcentajes no difieren significativamente ( $P > 0,05$ ).

La adición de Cisteamina en el medio de CIV, no afecta el número de blastómeras con respecto al control.

De acuerdo a los resultados obtenidos durante el desarrollo de este experimento, se puede afirmar que la adición de 100  $\mu$ M de Cisteamina en el d5 del CIV, favorece el desarrollo embrionario y la eclosión a las 72 hs de embriones congelados.

## EXPERIMENTO 5

En este experimento se evaluó el efecto en la supervivencia de embriones producidos *in vitro* por la adición de ácido linoléico en el medio de cultivo en d3 o d5.

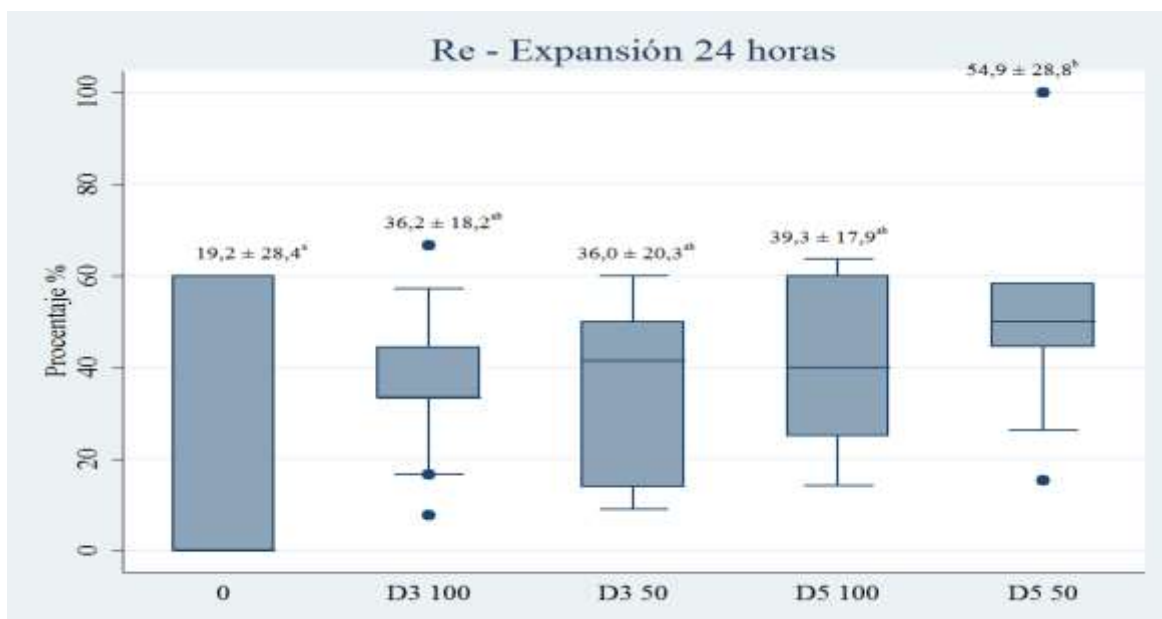
**Tabla 3.12.** Producción de Embriones con adición de Ácido Linoléico en el medio CIV.

GRUPO		OOCITOS (n)	CLIVAJE (%)	EMBRIONES (%)
CONTROL		355	45,9 ± 33,7 <sup>a</sup>	25,6 ± 19,6 <sup>a</sup>
D3	AL 100	250	72,7 ± 19,5 <sup>b</sup>	48,0 ± 24,4 <sup>b</sup>
	AL 50	250	79,3 ± 17,5 <sup>b</sup>	48,2 ± 23,5 <sup>a</sup>
D5	AL 100	264	64,9 ± 14,6 <sup>a</sup>	38,0 ± 9,6 <sup>a</sup>

<sup>ab</sup> Porcentajes en la misma columna con diferente superíndice, indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

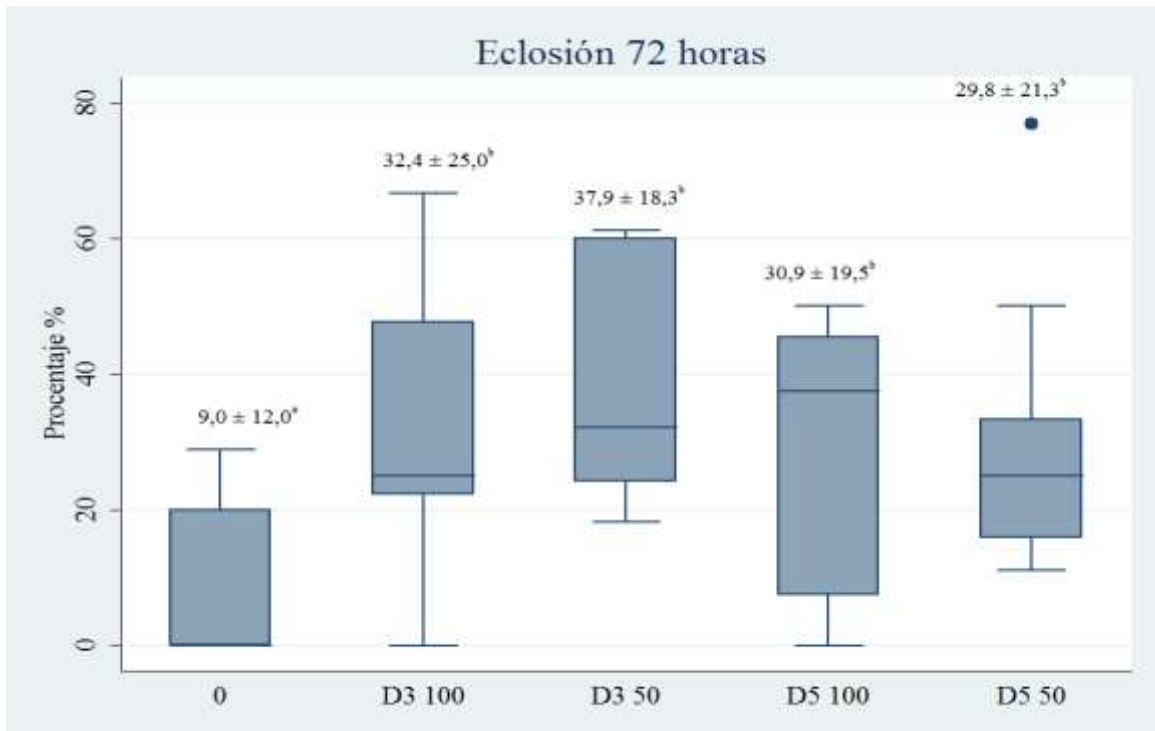
El Ácido linoleico adicionado al medio CIV en el día 3 ejerce un efecto favorable en el desarrollo embrionario, en concentración de 100  $\mu\text{M}$  presenta una tendencia a aumentar el número de posibles cigotos ( $P = 0,05$ ) y en la concentración de 50  $\mu\text{M}$  presenta aumento significativo en el clivaje ( $P = 0,04$ ). En cuanto al número de blastocitos, es favorable en concentración de 100  $\mu\text{M}$  ( $P = 0,02$ ) y presenta una tendencia al aumento en la de 50  $\mu\text{M}$  ( $P = 0,05$ ).

**Gráfico 3.3.** Diagrama de Box de re – expansión a las 24 hs. de embriones tratados con Ácido linoleico en el medio CIV en d3 o d5.



<sup>ab</sup> Porcentajes con diferente superíndice indica diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

**Gráfico 3.4.** Diagrama de Box de eclosión a las 72 hs. de embriones tratados con Ácido Linoleico en el medio CIV en d3 o d5.



<sup>ab</sup> Porcentajes con diferente superíndice indica diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

Su adición es favorable para la supervivencia embrionaria, tanto en la re-expansión como en la eclosión. A las 24 hs, se observó una tendencia favorable en d3 tanto con 100  $\mu\text{M}$  ( $P = 0,06$ ) como en 50  $\mu\text{M}$  ( $P = 0,08$ ); mientras que en d5, con 100  $\mu\text{M}$  presentó una tendencia al aumento de embriones recuperados luego de descongelación ( $P = 0,05$ ), con 50  $\mu\text{M}$  se presenta diferencia significativa con respecto al control ( $P = 0,002$ ). A las 72 hs. beneficia la eclosión en los días y concentraciones propuestas ( $P < 0,03$ ).

**Tabla 3.13.** Número de células de embriones tratados con Ácido Linoleico.

	<b>GRUPO</b>	<b>EMB ( n )</b>	<b>No. TOTAL CEL.</b>
	<b>CONTROL</b>	15	159,9 ± 34,2
<b>D3</b>	<b>AL 100</b>	15	157,7 ± 41,9
	<b>AL 50</b>	15	158,9 ± 29,8
<b>D5</b>	<b>AL 100</b>	15	159,3 ± 32,3
	<b>AL 50</b>	15	156,7 ± 19,8

Los porcentajes no difieren significativamente ( $P > 0,05$ ).

La adición de Ácido Linoleico como suplemento en el medio de CIV, no afecta el número de células.

En conclusión la suplementación del medio CIV en d3 con 100  $\mu$ M de Ácido Linoleico favorece la producción de blastocitos, al aumentar su cantidad con respecto al control; sin embargo al ser adicionada en d5 en concentración de 50  $\mu$ M mejora la supervivencia embrionaria al incrementar el número de embriones re – expandidos y ecloidos post – descongelación. Como el objetivo de esta tesis es aumentar la supervivencia a la congelación, se opta por la suplementación en d5 con 50  $\mu$ M.

## **EXPERIMENTO 6**



En este experimento se evaluó el efecto en la supervivencia de embriones producidos *in vitro* por la adición de fosfatidilcolina de soja en el medio de cultivo en d3 o d5.

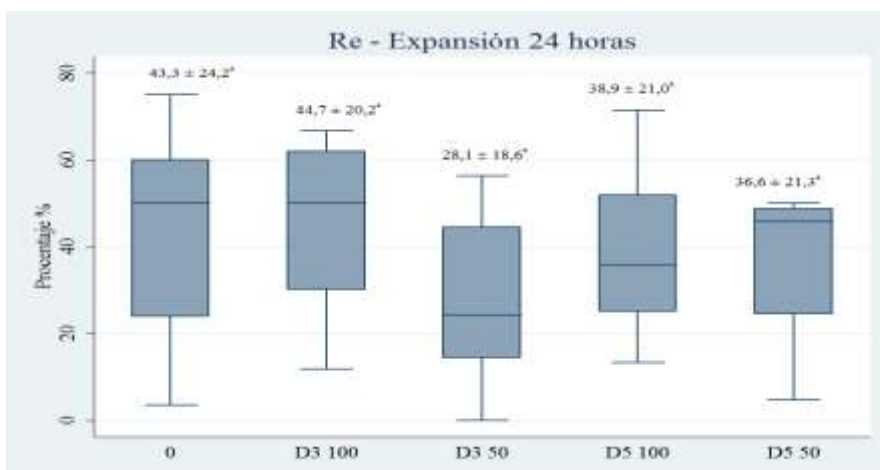
**Tabla 3.14.** Producción de Embriones con adición de Fosfatidilcolina de soja en el medio CIV en d3 o d5.

GRUPO		OOCITOS (n)	CLIVAJE (%)	EMBRIONES (%)
CONTROL		429	53,5 ± 15,9 <sup>a</sup>	24,0 ± 12,3 <sup>a</sup>
D3	LS 100	308	65,4 ± 9,7 <sup>a</sup>	29,0 ± 17,2 <sup>a</sup>
	LS 50	365	56,1 ± 11,7 <sup>a</sup>	26,2 ± 14,5 <sup>a</sup>
D5	LS 100	496	54,0 ± 14,7 <sup>a</sup>	24,5 ± 9,2 <sup>a</sup>
	LS 50	435	57,2 ± 14,3 <sup>a</sup>	29,7 ± 13,5 <sup>a</sup>

Los porcentajes no difieren significativamente ( $P > 0,05$ ).

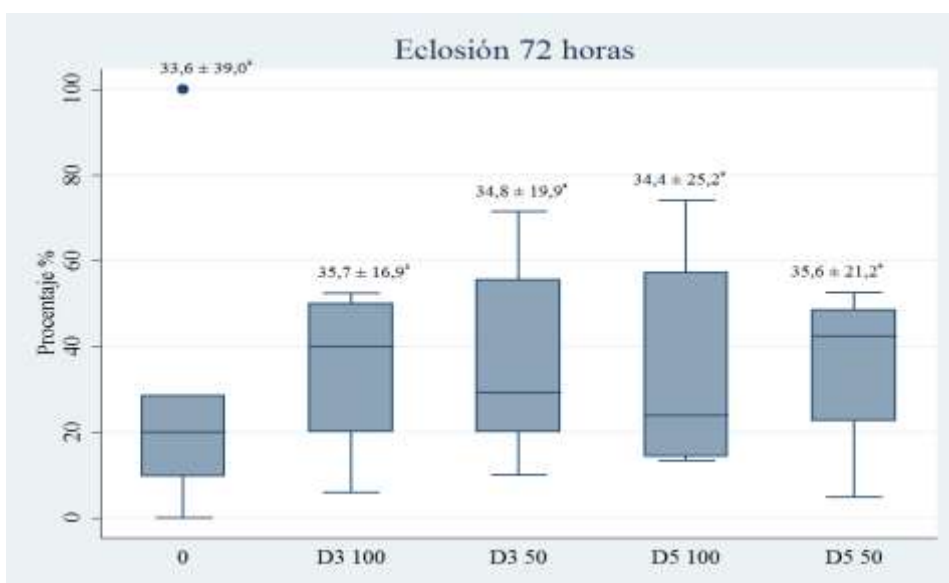
La adición de Fosfatidilcolina de soja no afecta el desarrollo embrionario.

**Gráfico 3.5.** Diagrama de Box de re – expansión a las 24 hs. de embriones tratados con Fosfatidilcolina de soja en el medio CIV en d3 o d5.



Los porcentajes no difieren significativamente ( $P > 0,05$ ).

**Gráfico 3.6.** Diagrama de Box de eclosión a las 72 hs. de embriones tratados con Fosfatidilcolina de soja en el medio CIV en d3 o d5.



Los porcentajes no difieren significativamente ( $P > 0,05$ ).

La suplementación del medio de CIV con Fosfatidilcolina de soja en d3 o d5, no influye en la supervivencia embrionaria a la congelación (Gráficos 3.5 y 3.6).

**Tabla 3.15.** Número de células de embriones tratados con Fosfatidilcolina de soja.

GRUPO		EMB ( n )	No. TOTAL CEL.
CONTROL		15	159,9 ± 34,2
D3	LS 100	15	160,7 ± 32,6
	LS 50	15	162,9 ± 28,2
D5	LS 100	15	164,3 ± 30,3
	LS 50	15	163,3 ± 33,3

Los porcentajes no difieren significativamente ( $P > 0,05$ ).

La adición de fosfatidilcolina de soja no afecta la calidad embrionaria con respecto al control, en lo referente al número de blastómeras. Aunque no hay diferencia significativa, su adición en d5 y en concentración de 100  $\mu\text{M}$  sería la que presentaría más blastómeras por embrión. Se plantea que hay una correlación entre la calidad y a viabilidad embrionaria con el número de células (Ushijima et al., 2008), por este motivo se selecciona la concentración 100  $\mu\text{M}$  en d5, para evaluar su sinergia junto con la Cisteamina y el AL.

## EXPERIMENTO 7

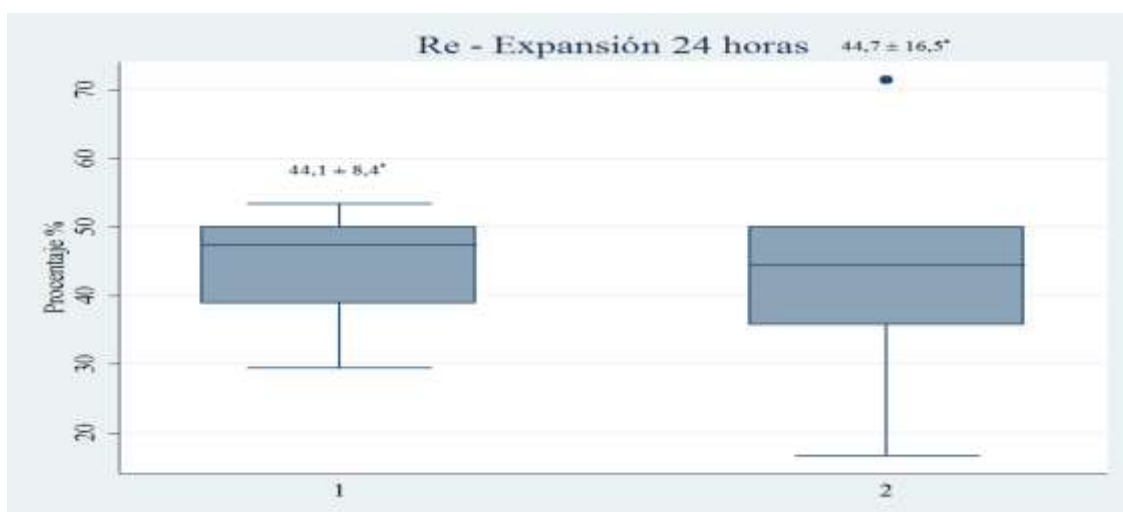
Según los experimentos 5, 6 y 7 se decide evaluar la interacción de 100  $\mu\text{M}$  de Cisteamina, 50  $\mu\text{M}$  de Ácido Linoleico y 100  $\mu\text{M}$  de Fosfatidilcolina de soja.

**Tabla 3.16.** Producción de Embriones con adición de Cisteamina, Ácido Linoleico y Fosfatidilcolina de soja en el medio CIV en d3 o d5.

GRUPO	OOCITOS (n)	CLIVAJE (%)	EMBRIONES (%)
CONTROL	429	61,6 ± 14,6	27,6 ± 4,4
CIST. + AL + LS	308	59,2 ± 16,2	30,0 ± 7,3

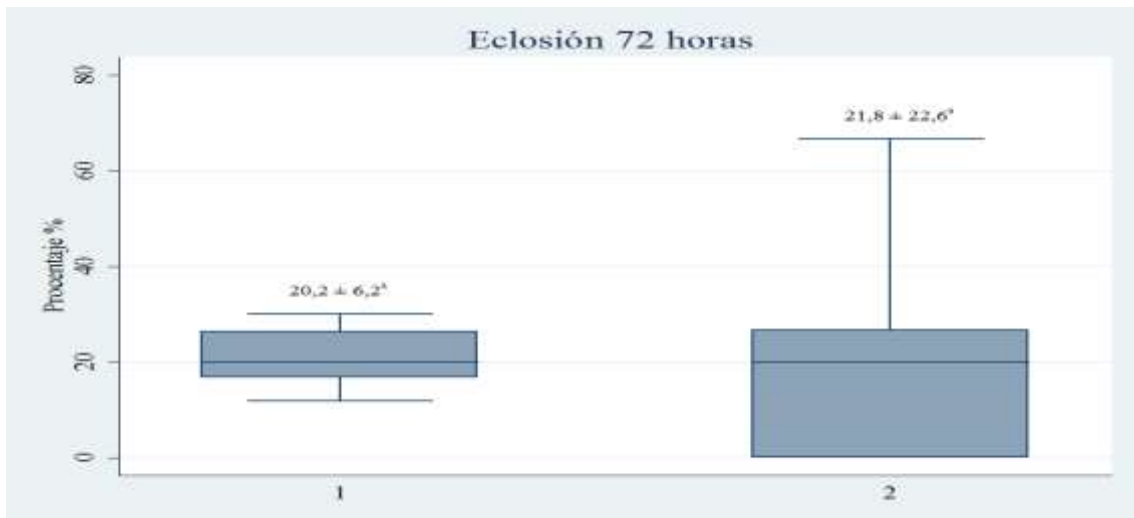
Los porcentajes no difieren significativamente ( $P > 0,05$ ).

**Gráfico 3.7.** Diagrama de Box de re – expansión a las 24 hs. de embriones tratados con Cist. + AL + LS en el medio CIV en d3 o d5.



Los porcentajes no difieren significativamente ( $P > 0,05$ ).

**Gráfico 3.7.** Diagrama de Box de eclosión a las 72 hs. de embriones tratados con Cist. + AL + LS en el medio CIV en d3 o d5.



Los porcentajes no difieren significativamente ( $P > 0,05$ ).

**Tabla 3.17.** Número de células de embriones tratados con Cisteamina, Ácido Linoleico y Fosfatidilcolina de Soja en el medio de CIV.

GRUPO	EMBRIONES (n)	No. CELULAS
CONTROL	15	121,2 ± 28,1
CIST. + AL + LS	15	126,3 ± 27,4

Los porcentajes no difieren significativamente ( $P > 0,05$ ).

La adición de estos tres suplementos en el medio de CIV en d5 no influye sobre el desarrollo embrionario, la supervivencia a la congelación y el número de células de los embriones.

## **CAPITULO 4**

### **DISCUSIÓN**

La adición de EGF al medio de MIV en concentración de 100 y 50 ng/ml favoreció la extrusión de CPI con respecto al control ( $86,3\% \pm 4,9$ ,  $81,4\% \pm 4,2$  y  $75,3\% \pm 4,3$ , respectivamente), lo cual es reportado en diversos estudios que han demostrado el efecto benéfico de la adición de EGF al medio de maduración, al favorecer la expansión de las células de los cúmulus y favorecer la maduración ovocitaria (Rieger et al., 1998; Palomares – Naveda et al., 2004). Esto se podría sustentar en que el EGF trabaja directamente sobre las células del cúmulus, ya que se han localizado receptores de este factor de crecimiento en estas mismas y en las células de la granulosa de varias especies, incluida la bovina (Yoshida et al., 1998; Qu et al, 2000), estimulando la síntesis de hialuronano, que podría interactuar con componentes específicos de la matriz celular (Tirone et al, 1997), mejorando significativamente la maduración citoplásmica

y nuclear de los ovocitos (Lonergan et al., 1996; Guler et al., 2000; Grazul – Biliska et al., 2003; Oyamada, 2004; Purohi et al., 2005) y participando en la regulación de la expresión genética, en la proliferación y diferenciación celular.

Según Lonergan (1996) la adición de EGF, independientemente de la concentración, a medios de cultivo M – 199, aumentan significativamente la proporción de ovocitos que alcanzan metafase II. Este aumento se sustenta posiblemente en el efecto que ejerce sobre la síntesis de proteínas, alterando las proteínas neosintetizadas durante la maduración y por lo tanto en la mejora del desarrollo embrionario (Lonergan et al., 1996; Sakaguchi, 2000 y 2002; Sirisathien et al., 2003). Esto sugiere un rol fisiológico para el EGF y las moléculas afines al EGF en la regulación intrafolicular de la maduración, aumentando la competencia ovocitaria.

En este trabajo no se presentó diferencia significativa en el desarrollo embrionario con la adición de EGF, estos resultados coinciden con los reportados por Nömm et al. (2015), quien adicionó 10 ng/ml de EGF al medio de MIV suplementado con SFB y lo comparó con uno sin adición de SFB, reportando que no hubo diferencia en la producción de blastocitos. Kobasashi (1994), reporta que la adición de EGF al medio de MIV aumentó el desarrollo de blastocitos. Aflalo et al. (2005 y 2007), resalta la importancia del EGF como modulador del sistema PA/plasmina (Activadores del plasminógeno / plasmina) durante el desarrollo embrionario previo a la implantación.

En este experimento la adición de EGF no influyó en la supervivencia embrionaria post-descongelación, aunque con la concentración de 100 ng/ml se presentó un leve aumento tanto en el porcentaje de re-expansión como en el de eclosión con respecto al control ( $55,8 \% \pm 20,4$  y  $27,5 \% \pm 28,2$  vs.  $43,9 \% \pm 16,9$  y  $16,8 \% \pm 14,1$ ), este experimento se realizó con adición de SFB en el medio MIV. Este resultado podría estar influenciado por la presencia de SFB en el medio de MIV, Saeki et al. (1991) plantearon que no se requiere de la presencia de suero para la MIV bovina, este

resultado fue comprobado por Park and Lin (1993) quienes observaron que la tasa de división de ovocitos bovinos madurados es más efectiva con suplementación de EGF y BSA que con SFC. La suplementación con suero siempre ha estado relacionada con la acumulación anormal de lípidos a nivel citoplasmático en los embriones bovinos producidos por FIV, lo cual es asociado a su sensibilidad a los procesos de criopreservación (Mucci y col, 2006). Nömm et al. (2015) establece que es posible tener un sistema PIV libre de suero y suplementado con EGF, con resultados de supervivencia a la congelación lenta mayores que el de los embriones obtenidos a partir de medios de MIV convencional, pero establece que hay que realizar más estudios al respecto. Abeydera et al. (2000), reportan que la adición de EGF en un medio de MIV libre de proteína estimula significativamente la síntesis de GSH en ovocitos porcinos.

La adición de Cisteamina en el medio de MIV (Experimento 2) no afecta el desarrollo embrionario, a pesar de que aparentemente aumenta el porcentaje de embriones con respecto al control ( $32,0 \% \pm 9,5$ ,  $31,4 \% \pm 14,2$  y  $26,8 \% \pm 10,0$  para 100 ng/ml, 50 ng/ml y control). Silva (2010), reporta que los porcentajes de clivaje y producción embrionaria son similares al suplementar el medio de maduración con 150  $\mu\text{M}$  de Cisteamina con respecto al control (Clivaje: 86% vs. 89%, % Blast.: 29% vs. 31%), lo cual coincidiría con este trabajo. Esto puede ser a causa de que los ovocitos permanecen durante la MIV en condiciones de bajo metabolismo de GSH intracelular (Rieger et al, 1992; De Matos, 1993), ya que 24 horas no sería tiempo suficiente para comprometer el desarrollo posterior. También existe la posibilidad que el medio con suplemento proteico pueda inhibir la acción de los antioxidantes (Li et al., 1993).

Ikeda et al. (2000), sugiere que la reducción en el desenvolvimiento embrionario en los sistemas PIVE podrían estar asociados con un exceso de metabolitos como el amonio o con el aumento de la concentración de radicales libres en el medio de producción, estas condiciones forma ERO en bovinos produciendo lesiones en el ADN (Takashi, 2000). A su vez los ERO aumentan la demanda de enzimas antioxidantes para poder mantener el control homeostático y mantener el potencial de desarrollo embrionario (Silva et al, 2010).



Merton et al. (2013), reporta que la presencia de Cisteamina durante la MIV incrementa significativamente la tasa de producción embrionaria a partir de ovocitos obtenidos de ovarios de frigorífico. El aumento numérico en la producción embrionaria se debe a un aumento en la concentración de GSH intracelular después de la inducción de su síntesis con componentes tiol (De Matos, 2000). Oyamada (2004), informa que la adición de compuestos tiol como Cisteína,  $\beta$  - mercaptoetanol y cisteamina al medio de maduración promueve la síntesis de GSH en el ovocito. La GSH es sintetizada y degradada por la  $\alpha$  - glutamilciclasa y su biosíntesis depende de la disponibilidad de cisteína en el medio. Sin embargo la Cisteína es inestable en el medio y se oxida fácilmente a Cistina. La Cisteamina en medio de cultivo puede reducir la Cistina a Cisteína, promoviendo la absorción de Cisteína y mejorando la síntesis de GSH y permitiendo plantear que su adición incrementa la eficiencia del medio de maduración (Nagai, 2001). Varios informes demuestran mejoras después de la adición de antioxidantes en el medio de MIV (De Matos y Furnus, 2000; De Matos et al., 2002), mientras otros dicen que no influye en la tasas de división y desarrollo embrionario (Ali et al., 2003), aunque si reportan aumento de GSH intracelular. Rocha – Frigoni (2012), reportó que la suplementación con antioxidantes en el medio de maduración reduce los niveles intracelulares de ERO y la tasa de apoptosis, pero no aumenta significativamente el desarrollo embrionario, entonces los resultados de la adición de antioxidantes al medio MIV son contradictorios.

En este experimento se evidencia que al adicionar Cisteamina a 100  $\mu$ M hay diferencia significativa en el % CPI con respecto al control (80,0 %  $\pm$  6,5 vs. 72,3%  $\pm$  3,8), sugiriendo que esta concentración podría beneficiar el proceso de maduración nuclear.

La adición de Cisteamina en el medio MIV no afecta la supervivencia embrionaria post-descongelación, aunque en concentración de 100  $\mu$ M se presenta una tendencia a mejorar la re-expansión de los embriones descongelados con respecto al control (63, 3 %  $\pm$  9,5 vs. 53,9 %  $\pm$  8,4; P = 0,08), lo cual es coincidente con lo

reportado por Rocha-Frigoni, (2012), quién reporta que la adición de antioxidantes al medio MIV no aumenta la supervivencia post-vitrificación, al igual que Merton et al.(2013), informan que la presencia de Cisteamina durante la MIV no afecta la criotolerancia.

En el tercer experimento se evaluó la adición de 100 ng/ml de EGF y de 100  $\mu$ M de Cisteamina, en el medio de maduración. Se observó que la suplementación de estos dos aditivos al medio MIV favoreció el desarrollo embrionario al aumentar el porcentaje de estructuras clivadas ( $69,5\% \pm 7,1$  vs.  $52,0\% \pm 6,6$ ) y el porcentaje de embriones ( $32,1\% \pm 4,0$  vs.  $23,8\% \pm 4,0$ ) respecto al control. Oyamada y Fukui (2004), reportan que la adición de 10 ng/ml de EGF y 100  $\mu$ M de Cisteamina en el medio de maduración incrementa significativamente la proporción de ovocitos clivados respecto al control y la frecuencia de desarrollo de blastocitos, lo cual es coincidente con lo encontrado en este experimento. Aunque Oyamada reporta que no hay un efecto significativo sobre la maduración nuclear, en este experimento si se presentó con respecto al control ( $81,3\% \pm 6,7$  vs.  $72,1\% \pm 6,7$ ). Se hipotetiza que la adición de Cisteamina al medio MIV incrementa la eficiencia de dicho medio y que la adición de EGF podría incrementar el contenido intracelular de GSH en ovocitos porcinos; sin embargo esto no ha sido reportado en bovinos (Oyamada y Fukui, 2004).

Oyamada reporta un aumento significativo en la supervivencia de los embriones post – vitrificados, cuando los ovocitos son puestos a madurar en un sistema de cultivo individual en medio mSOFaa + PVA y suplementado con Cisteamina y EGF al ser comparado con medio TCM suplementado con 10% SFB, al parecer la presencia de un compuesto proteico podría estar influyendo en el resultado obtenido.

La combinación de estos dos aditivos en el medio de maduración podría mejorar la maduración nuclear y el desarrollo embrionario por los siguientes planteamientos:

- El GSH aportado por la Cisteamina, al ser un factor intracelular del ovocito de importancia en la maduración citoplasmática, ya que lo protege de los efectos tóxicos generados por los ERO en las condiciones convencionales de 5% de CO<sub>2</sub> al mantener un ambiente de óxido – reducción adecuado y al reducir los puentes disulfuro de la protamina de la cabeza espermática favoreciendo la formación de PNM (Pronúcleo Masculino) (Meister and Tate, 1976, 1979).
- El EGF estimula en los COC´s la producción de ácido hialurónico y su retención dentro de la matriz intracelular de los cúmulus expandidos, teniendo un efecto positivo en la monoespermia (Prochazka et al., 2000) y por ende en el desarrollo embrionario.

De lo anterior se deduce que la primera hipótesis planteada no se cumple; la supervivencia de los embriones congelados producidos *in vitro*, no aumenta con la adición de Cisteamina y EGF en el medio de MIV; estos resultados podrían ser afectados por la presencia de SFB en el medio MIV. También influiría el origen y calidad de los COC´s, que pueden ser afectados por la técnica de obtención del ovocitos; además, los animales llevados al frigorífico pueden estar en cualquier etapa del ciclo estral y los COC´s se recuperan de una amplia gama de tamaños de folículos y en todas las posibles etapas de la onda folicular, incluyendo folículos en fase de dominancia o en fase de atresia (Merton et al., 2013).

Los cigotos y embriones son más frágiles a sufrir daño oxidativo al ser expuestos a factores externos, como condiciones inapropiadas de cultivo. La síntesis de novo de GSH sucede en el estadio de 9 a 16 células en la vaca (Raussel, 2005). La tolerancia de los embriones a un estrés oxidativo difiere a lo largo de los distintos estadios de desarrollo embrionario, es por esto que se estudió la suplementación del medio CIV con Cisteamina en d3 o d5, ya que es conocida la acción de este agente reductor, al incrementar el nivel intracelular de GSH y el potencial de desarrollo embrionario. En el experimento 4, se observó que aunque la adición de cisteamina en las concentraciones propuestas en el d3 no afectan el clivaje, si presenta una tendencia a la disminución de la producción embrionaria, estos resultados son coincidentes con lo informado por

Merton (2013), quien observó que al adicionar Cisteamina 0.1 mM en el medio MIV y 0.01, 0.05 y 0.1 mM en el medio CIV a partir de los días 1 al 4 del cultivo, la tasa de producción de blastocitos se vio afectada negativamente, más no afectó las tasas de clivaje. Esto puede ser debido a que las concentraciones propuestas no son suficientes, ya que como es sabido los embriones de mamíferos tienden a sufrir bloqueo del desarrollo embrionario en condiciones *in vitro*. En este bloqueo se activa la expresión del genoma embrionario, influenciado por las variaciones en el nivel endógeno de hidroxidación lipídica, en la capacidad para quelar metales de transición y en la actividad antioxidante, que determinan si el embrión prosigue con su desarrollo normal (Raussel, 2005). De Matos et al. (2002), encontraron que al suplementar con Cisteamina durante la MIV y en los días 2 a 4 de CIV, la producción de embriones es óptima en concentración de 0,05 mM (Merton et al., 2013) lo cual no es coincidente con los resultados de Merton y de este trabajo, esto podría sustentarse en que la adición de Cisteamina en la MIV y con embriones cultivados con atmosfera de O<sub>2</sub>, el nivel de GSH ya es el óptimo durante el desarrollo embrionario temprano, especulándose que la suplementación con Cisteamina adicional durante los primeros días de CIV puede dar lugar a un nivel limitado de ERO, consecuentemente este desequilibrio pudo haber interferido con la activación del genoma embrionario durante la transición del control maternal al cigótico (Merton et al., 2013).

En este trabajo la adición de 100 µM de Cisteamina en d5 es favorable para la producción de embriones, esto se podría fundamentar en que los niveles más altos de GSH se presentan cuando se está acercando a la etapa de blastocito. La Cisteamina estaría contribuyendo probablemente a disminuir la cantidad de ERO y a aumentar la concentración intracelular de GSH, lo cual mejora el desarrollo embrionario. Silva (2010), reportó que al adicionar Cisteamina en concentración 150 µM tanto en el medio de maduración como en el de cultivo, mejora la producción de embriones. En el blastocito, el peróxido de Hidrógeno, presente en el fluido del blastocelo, tiene un rol importante en la diferenciación, provocando la apoptosis de las células del pre – trofotodermo. Mientras estas células pierdan la capacidad de sintetizar GSH, las otras células embrionarias sintetizan GSH protegiéndose de los efectos oxidativos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,

en conclusión la mayor reducción del contenido de GSH coincide con la activación del genoma embrionario. Los estadios de desarrollo embrionario previas al blastocito son más sensibles a los efectos nocivos que disminuyen el contenido de GSH (Raussel, 2005). Reportan que al suplementar el medio de CIV con 1mM de GSH se favoreció el desarrollo embrionario; sin embargo los efectos benéficos de esta suplementación es variable (Raussel, 2005).

La adición de Cisteamina en CIV no afectó el número total de células por embrión, esto coincide con lo reportado por Rocha – Fragoni (2013) quien informa que la adición de antioxidantes intracelulares (Cisteína y  $\beta$  – mercaptoetanol) y extracelulares (Catalasa) en diferentes etapas de producción (MIV y CIV) no afecta el número total de blastómeras.

La adición de Cisteamina en las concentraciones propuestas en d5 favoreció el porcentaje de eclosión, De Matos et al. (2002), reportan que con la adición de Cisteamina tanto en MIV como en CIV, la supervivencia embrionaria después de descongelación se vio favorecida, esto sustentado en el aumento de GSH intracelular. Entre tanto, Rocha – Fragoni (2013), demostró que la suplementación con antioxidantes durante MIV y/o CIV no incrementan la supervivencia después de vitrificación, aunque si reduce los ERO intracelulares y la tasa de apoptosis. La adición de antioxidantes en el medio CIV da resultados contradictorios; algunos autores no reportan efectos, mientras que otros si (Iwata et al., 1998; De Matos et al, 2002; Ali et al., 2003) o efectos desfavorables (Van Soom et al., 2002). Thompson et al. (1990), afirma que la acción de los antioxidantes puede ser enmascarada por la condiciones de incubación, incluyendo la adición de BSA a los medios.

En el experimento 5, la suplementación con ácido linoleico es favorable para el porcentaje de clivaje en d3 con 50  $\mu$ M, el porcentaje de embriones en d3 con 100  $\mu$ M, y

para la supervivencia tras descongelación en d5 con 50  $\mu$ M, más no afecta el número de blastómeras.

Imai (1997) reporta que el ácido linoleico-albumina al ser adicionado en el medio CIV presenta efectos favorables en la supervivencia embriones bovinos después de congelación, esto atribuible al incremento en la fluidez de la membrana, debido a la incorporación directa del ALA en la bicapa lipídica y depleción del colesterol de membrana . Bailey (2014) reporta que la disminución en la criotolerancia de ovocitos y embriones se asocia con un mayor contenido de lípidos citoplasmáticos. Estudios previos en vacas han demostrado que la modificación nutricional inducida de los componentes foliculares, identificando el trans – 10, cis – 12 ácido linoleico conjugado (CLA) como un potente inhibidor de la síntesis de grasa en la leche en vacas lactantes y su inclusión en el medio de cultivo mejora la supervivencia del embrión después de la descongelación. Batista (2014) reporta también sensibilidad al congelado de embriones de Bos Indicus y sus cruces debido a la acumulación de lípidos neutros en el citoplasma. Informa que cigotos cultivados en CR2aa con 100 m/L de CLA no tiene efecto sobre las tasas de clivaje, producción embrionaria y en los niveles de genes m – RNA relacionados con el estrés celular y apoptosis. Pero si un aumento significativo en la tasa de re – expansión comparado con el control, más no en eclosión. La suplementación con CLA disminuye el contenido de lípidos neutros al afectar la síntesis de triglicéridos mediante la reducción de la expresión génica de 1 – acilglicerol, 3 – fosfato o – aciltransferasa (AGPAT). Al ácido linoleico, sobre todo a sus isómeros, en particular el CLA, se le atribuye disminuir la deposición citoplasmática de lípidos, demostrando actividad antilopógena (Evans et al., 2002; Pereira et al, 2007 y 2008). Pereira (2008) reporta que los CLA en embriones bovinos *in vitro*, disminuyen el diámetro de las gotas lipídicas mejorando la crioresistencia. Accorsi (2015) estudió el efecto de la adición de AL a un medio CIV semidefinido en concentración 100  $\mu$ M con adición de BSA, reportando una reducción en la tasa de desarrollo embrionario con respecto al control ( $p < 0.05$ ), pero influyendo positivamente en el descenso del contenido lipídico intracelular aumentando consecuentemente la supervivencia embrionaria luego de 24 hs post – congelación y no afectando el número total de células por embrión. El mejoramiento en

la supervivencia embrionaria se pueden fundamentar en que los ácidos grasos actúan modificando la composición de los lípidos de la membranas embrionarias, influyendo en su fluidez (Accorsi, 2015). El mecanismo por el cual el CLA afecta la acumulación de lípidos en el embrión es por una reducción en la incorporación y/o ensamblaje de los triglicéridos antes que por inhibición de la síntesis de novo (Pereira, et al., 2014), esto también podría ser aplicativo para el AL.

En humanos (Haggarty et. al., 2006) se han empleado ácidos grasos C<sup>13</sup>, en horas posteriores al cultivo, cuando el embrión se encuentra en 8 células, ya que embriones en estadio de 4 células poseen mayores concentraciones de ácidos grasos insaturados y concluyeron que el AL es más importante en los estadios finales de desenvolvimiento. El AL estimula la proteína Kinasa C, que es crítica en el crecimiento y diferenciación celular (Haggarty et al., 2006, Accorsi, 2015).

Actualmente se estudia la influencia tanto del ácido linoleico como del linoleico en el desarrollo embrionario. Yang (2012) estudió el efecto de la suplementación con Ácido Linolénico en el desarrollo temprano de embriones In Vitro en búfalos, los presuntos cigotos fueron transferidos a medio CIV (TCM 199 + 10% SFB) suplementado con 0, 10, 50, 100 y 200 µM de ácido linolénico. Los resultados mostraron que las tasas de clivaje no difirieron significativamente entre grupos aunque si hubo un aumento numérico en las concentraciones de 50 y 100 µM con respecto al control. El tratamiento 50 µM resultó en un porcentaje significativamente más alto en la tasa de desarrollo de blastocitos comparado con el grupo control y los otros tratamientos, siendo esta concentración la mejor para el desarrollo embrionario en búfalos. Este resultado sería similar al encontrado en este trabajo, pero con ácido linoleico y en especie bovina. Se reporta que los ácidos grasos poli-insaturados son potentes inhibidores de la glucólisis y lipógenesis de novo, a través de la regulación de la glucosa – 6 – fosfato deshidrogenasa (G6PDH), L – Piruvato quinasa (PK – L), ácido graso sintetasa (FAS) y acetil – CoA carboxilasa (ACC) (Dentin et al., 2008).

En el experimento 6, se observó que la adición de Fosfatidilcolina de soja al medio CIV en d3 y d5, no afecta el desarrollo embrionario, el número de células por embrión y la supervivencia a la congelación. Pugh, (1998) evalúa el efecto de suplementar el medio de CIV con liposomas que contenían lecitina, esfingomielina y colesterol. La esfingomielina y el colesterol en razón 1.1, 1:4 y 4:1 fueron adicionados a 50, 100 y 150 microgramos/ml de lecitina, los blastocitos fueron congelados en 1.5 M de etilenglicol. Reportó que la presencia de liposomas en el medio de CIV no afectó el clivaje, el desarrollo embrionario y la supervivencia de blastocitos después de la congelación. Sin embargo la presencia de lecitina sola en concentración de 200 µg/ml afecta negativamente la supervivencia del blastocito en el medio de congelación, probablemente por la alteración de la composición de la membrana embrionaria. En el caso de este experimento se puede hipotetizar que los días propuestos no son los indicados para la adición de Fosfatidilcolina de soja y las concentraciones empleadas no son suficientes o adecuadas para sustituir algunos fosfolípidos de membrana y/o no entren a la membrana embrionaria para alterar la concentración de los lípidos neutros y así formar una película protectora alrededor de las células embrionarias, evitando así la formación de hielo intracelular y proteger aún más que el control de daños mecánicos. En este caso ejerciendo función de estabilizador de membrana.

Guyader, 1999, evalúa el efecto de la lecitina de soja en una solución de glicerol para congelación lenta de embriones producidos In Vitro. La congelación se realizó en dos etapas con glicerol al 5% y al 10% con 0.2 M de sacarosa, la lecitina se añadió al 0.1% w/v, observando que no ejerce efecto alguno en la re-expansión pero si en la eclosión significativamente a las 72 hs. La Lecitina de soja ejerce función de crioprotector no penetrante.

En el último experimento (Experimento 7) la adición al medio de CIV en d5 de 100 µM de Cisteamina, 50 µM de ácido linoleico y 100 µM de Fosfatidilcolina no influyó sobre el desarrollo embrionario, el número de células por embrión y la supervivencia a



la congelación, probablemente porque los ácidos grasos insaturados empleados no tuvieron efecto sobre la estabilización de la membrana embrionaria, al no incorporarse a ella durante la CIV y no inducir cambios en su fluidez. También se podría plantear que la adición de Fosfatidilcolina no ejerce un efecto positivo junto con la Cisteamina y el ácido linoleico, siendo probable que sólo la combinación de Cisteamina y ácido linoleico en las concentraciones y día propuesto, si pueda ser favorable para la supervivencia a la congelación. Esto basado también en los resultados de Pugh (1998) que reportó que la adición de lecitina de soja a una preparación de liposomas no afecta el desarrollo embrionario, pero si la supervivencia embrionaria, probablemente mediante la alteración de la membrana plasmática.

Por lo anterior la hipótesis dos del presente trabajo no se cumple, un medio de cultivo secuencial suplementado con Cisteamina, Acido Linoleico y Fosfatidilcolina de Soja, no aumenta la supervivencia de los embriones congelados producidos *in vitro*. Sería interesante evaluar el comportamiento de la adición de Cisteamina y Acido linoleico en el d5 de CIV, en las concentraciones propuestas.

## **CAPITULO 5**

### **CONCLUSIONES**

Los resultados de esta tesis no confirman las hipótesis propuestas. La adición de 100  $\mu\text{M}$  de Cisteamina y 100 ng/ml de EGF en el medio MIV, no aumenta la supervivencia de embriones congelados producidos *In Vitro*. La adición de 50  $\mu\text{M}$  de Ácido Linoleico, 100  $\mu\text{M}$  de Cisteamina y 100  $\mu\text{M}$  de Fosfatidilcolina de Soja en el d5 de CIV, no aumenta la supervivencia de los embriones congelados producidos *In Vitro*.

Las conclusiones específicas de esta tesis son:

- La adición de 50 ng/ml de EGF al medio MIV favorece la maduración nuclear de los ovocitos.
- La adición de 100 ng/ml de EGF al medio MIV favorece la maduración nuclear de los ovocitos.
- La adición de 50 ng/ml o 100 ng/ml de EGF no ejerce influencia sobre el desarrollo embrionario y la supervivencia de embriones congelados.
- La adición de 100  $\mu$ M de Cisteamina al medio MIV favorece la maduración nuclear de los ovocitos.
- La adición de 100  $\mu$ M de Cisteamina al medio MIV presenta una tendencia al aumento de embriones re – expandidos descongelados.
- La adición de 100  $\mu$ M de Cisteamina y 100 ng/ml de EGF favorece el desarrollo embrionario, al producir un aumento en el porcentaje de clivaje y en el porcentaje de embriones, pero no influye en la supervivencia embrionaria posterior a la descongelación.
- La adición de 50 o 100  $\mu$ M de Cisteamina en el d3 de CIV, no es favorable para el desarrollo embrionario al producir una disminución en el porcentaje de embriones.

- La adición de 100  $\mu\text{M}$  de Cisteamina en el d5 de CIV favorece la producción de embriones, al aumentar su porcentaje.
- Suplementar con 50 o 100  $\mu\text{M}$  de Cisteamina en el d5 de CIV favorece la eclosión a las 72 hs. de embriones criopreservados mediante congelación lenta con EG.
- La adición de 50 o 100  $\mu\text{M}$  de Cisteamina en el medio CIV no afecta el número de blastómeras en el embrión.
- Suplementar con 50  $\mu\text{M}$  de AL en el d3 de CIV favorece el clivaje y presenta una tendencia al aumento en el porcentaje de embriones.
- La adición de 100  $\mu\text{M}$  de AL en el d3 de CIV presenta una tendencia a aumentar la división celular y favorece la producción de embriones.
- La adición de 50  $\mu\text{M}$  de AL en el d5 de CIV favorece la re-expansión de embriones criopreservados mediante congelación lenta con EG.
- La adición de 50 o 100  $\mu\text{M}$  en d3 o d5 de CIV favorece la eclosión de embriones descongelados.
- La suplementación de AL al medio de CIV no afecta el número de blastómeras.
- La suplementación de Fosfatidilcolina de Soja en el medio de CIV no ejerce efecto sobre el desarrollo embrionario, supervivencia a la criopreservación mediante congelación lenta con EG y el número de blastómeras.

## **CAPITULO 6**

### **BIBLIOGRAFIA**

Abe, H.; Otoi, T.; Tachikawa, S. et al. 1999. Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro. *Anat. Embryol.* (Berl.). 199: 519 – 527.

Abe, H.; Yamashita, S.; Itoh, T. et al. 1999. Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro matured and fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of

- embryos cultured either in serum free médium or in serum supplemented medium. *Mol. Reprod. Dev.* 53: 325 – 335.
- Abe, H. and Hochi, H. 2003. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free. *J. Reprod. Dev.* 49: 193 – 202.
- Abe, H.; Shiku, H. et al. 2004. In Vitro culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos. *J. Mamm Ova Res*, 21: 22 – 33.
- Abeydeera, LR.; Wang, WH. et al. 1998. Presence of epidermal growth factor during In Vitro maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after in vitro fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 51(4): 395 – 401.
- Abeydeera, LR.; Wang, WH. et al. 2000. Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology*. 54: 787 – 797.
- Accorsi, MF.; Leão, BC. et al. 2015. Reduction in cytoplasmic lipid content in bovine embryos cultured in vitro with linoleic acid in semi – defined médium is correlated with increase in cryotolerance. *Zygote*. 9: 1 – 10.
- Adamiak, SJ.; Powell, K. et al. 2006. Body condition, dietary carbohydrates and fatty acids determine post – fertilisation development of bovine oocytes In Vitro. *Reproduction*. 131: 247 – 258.
- Aflalo, ED.; Sod-Moriah, UA. et al. 2005. Expression of plasminogen activators in preimplantation rat embryos developed in vivo and in vitro. *Reproductive, Biology and Endocrinology*. 3:7. doi: 10.1186/1477-7827-3-7.
- Aflalo, ED.; Sod- Moriah, UA. et al. 2007. EGF increases expression and activity of Pas in preimplantation rat embryos and their implantation rate. *Reproductive, Biology and Endocrinology*. *BioMed Central*. 5(4): 1 – 11.
- Agarwal, A.; Gupta, S. and Sharma, RK. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive, Biology and Endocrinology*. *Review*. 3: 28.

- Agca Y.; Liu, J. et al. 1998. Effect of developmental stage on bovine oocyte plasma membrane water and cryoprotectant permeability characteristics. *Mol. Reprod. Dev.* 49: 408 – 415.
- Agnez –Lima, LF.; Melo, JTA. et al. 2011. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. *Mutation Research – Reviews in Mut. Res.* 751 (1): 15 – 28.
- Aires, VA.; Hinsch, KD. et al. 2003. In Vitro and In Vivo comparison of egg yolk – based and soybean lecithin – based extenders for cryopreservation of bovine. *Theriogenology.* 60: 269 – 279.
- Akhter, S.; Ansari, MS. et al. 2012. Soya – lecithin in extender improves the freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 47: 815 – 819.
- Ali, AA.; Bilodeau, JF. and Sirard, MA. 2003. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology.* 59(3-4): 939 – 949.
- Alvarez, JG. and Storey BT. 1993. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J. Androl.* 14: 232 – 241.
- Assumpcao MEOA.; Milazzotto, MP. et al. 2008. In Vitro survival of in vitro – produced bovine embryos cryopreserved by slow freezing, fast freezing and vitrification. *Animal Reproduction.* 5: 116 – 120.
- Ávila –Portillo, LM.; Madero, J. y otros. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología.* 57 (4): 291 – 300.
- Aykurt, M.; Zaki, G. et al. 2002. Freezing phenomena in ice water systems. *Energy Conversion and Management.* 43: 1771 – 1789.
- Bailey, CL.; Sarmiento-Guzmán, JA. et al. 2014. Effects of dietary conjugated linoleic acid supplementation on bovine oocyte lipid metabolism, lipid composition, and embryo cryotolerance. *Reprod. Fert. Dev.* 27 (1): 117 – 18. doi: 10.1071/RDv27n1Ab49.

- Bain, NT.; Madan, P. and Betts DH. 2011. The early embryo response to intracellular reactive oxygen species is developmentally regulated. *Reprod. Fert. Dev.* 23 (4): 561 – 575.
- Ballard, CB.; Looney, CR. et al. 2008. Comparing oocyte lipid content with circulating cholesterol and triglyceride levels of *Bos Taurus* and *Bos Indicus* donor cows. *Reprod. Fert. Dev.* 20: 177.
- Batista, RJ.; Raposo, NR. et al. 2014. Trans – 10, Cis -12 conjugated linoleic acid reduces neutral lipid content and may affect cryotolerance of In Vitro – produced crossbred bovine embryos, *J. Anim. Sci. Biotech.* 5: 33. *BioMed Central*: 1 – 8.
- Bavister, B.D.; Rose-Hellekant, T.A. et al. 1992. Development of in vitro matured / in vitro fertilized bovine embryos into morula and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology.* 37: 127 – 146.
- Bailey, CL.; Sarmiento-Guzmán, JA. et al. 2014. Effect of dietary conjugated linoleic acid supplementation on bovine oocyte lipid metabolism, lipid composition, and cryotolerance. *Reprod. Fert. Dev.* 27 (1): 117 – 118. doi: 10.1071/RDv27n1Ab49.
- Block, J., Fischer – Brown, AE. et al. 2007. The effect of In Vitro treatment of bovine embryos with IGF – I on subsequent development in utero to day 14 of gestation. *Theriogenology.* 68: 153 -161.
- Block, J.; Zolini, AM. et al. 2015. Effects of L – Carnitine and trans – 10, cis – 12 conjugated linoleic acid supplementation during maturation on development and cryotolerance of bovine embryos produced In Vitro. *Reprod. Fert. Dev.* 28 (2): 147. [Dx.doi.org/10.1071/RDv28n2Ab34](https://doi.org/10.1071/RDv28n2Ab34).
- Boiso, I. Principios Básicos de Criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad.* Ponencia. 18 (4): Julio – Agosto, 2001. 1 Congreso ASEBIR.
- Boni, R.; Tosti, E., et al. 1999. Intracellular communication In Vivo and In Vitro produced bovine embryos. *Biol. Reprod.* 61: 1050 – 1055.

- Bousseau, S.; Brillard, JP. et al. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the In Vitro and In Vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*. 50: 699 – 705.
- Caamaño, JN.; Ryoo, Z. et al. 1996.  $\beta$  - mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine in vitro – matured/in vitro fertilized embryos. *Biol. Reprod.* 55: 1179 – 1184.
- Camous, S.; Heyman, Y. et al. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fert.* 72: 479 – 485.
- Cárdenas-Rodríguez, N. y Chaverri, JP. 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química – Biomédica*. 17 (2): 164 – 173.
- Castillo, C., Benedito, JL., et al. 2001. Importance of oxidative stress in cattle: its relationship with the physiological condition (pregnancy and parturition) and nutrition. *Arch. Med. Vet.* 33 (1). doi: 10.4067/s50301-732x200100100001.
- Castillo – Martín, M.; Bonet, S., et al. 2013. Comparative effects of adding  $\beta$ -mercaptoethanol or L – ascorbic acid to culture or vitrification – warming media on IVF porcine embryos. *Reprod. Fert. Dev.* 26 (6): 875 – 882.
- Catalá, A. 2011. Lipid peroxidation. *Principles of Free Radical Biomedicine*. Vol. 1. Ed. K. Pantopoulos, HM. Schipper. Nova Science Publisher, Inc.
- Chaubal, SA.; Molina, JA. et al. 2006. Comparison of different transvaginal ovum pick – up protocols to optimize oocyte retrieval and embryo production over a 10 – week period in cows. *Theriogenology*. 65: 1631.
- Citit, U. and Bagis, H. 2013. Comparasion of cryoprotective effects of iodixional, threalose and cysteamine on ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 139: 38 – 44.
- Corcoran, D.; Fair, T. et al. 2006. Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in In Vitro compared with In Vivo cultured bovine embryos. *Reproduction*. 131: 651 – 660.



- Cornejo, R. 2011. Epidrml Growth Factor and mammary epithelial differentiation. *Int. J. Morphol.* 29 (3): 821 – 824.
- Deleuze, S. and Goudet, G. 2010. Cysteamine supplementation of In Vitro maturation media. *Reprod. Domest. Anim.* 45 (6). 476 – 482.
- De Matos, DG.; Furnus, C., et al., 1995. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 42(4): 432 – 436.
- De Matos,D.; Furnus, C., et al., 1996. Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured and its effect on embryo development and freezability. *Mol. Reprod. Dev.* 45: 451 – 457.
- De Matos,D.; Herrera, C., et al., 2000. Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine in vitro embryo production. *Mol. Reprod. Dev.* 62(2): 203 - 209.
- De Matos, DG. and Furnus, C. 2000. The important of having high glutathione level alter bovine in vitro maturation on embryo development: effect of  $\beta$ -mercaptoethanol, cysteine and cysteine. *Theriogenology.* 53(3): 761 – 770.
- De Matos, DG. et al. 2002. Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology.* 57(5): 1443 – 1451.
- Dentin, R.; Benhamed, F. et al. 2005. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J. Clin. Invest.* 115 (10): 2843 – 2854.
- De Souza, PA.; Watson, AJ. et al. 1998. Transient expression of a translation initiation factor is conservatively associated with embryonic gene activation in murine and bovine embryos. *Biol. Reprod.* 4: 969 – 977.

- Dhali, A.; Anchamparuthy, V. et al. 2011. Developmental and quality of bovine embryos produced In Vitro using growth factor supplemented serum free system. *Open J. Anim. Sci.* 1(3): 97 – 105.
- Dickinson, DA. and Forman, HJ. 2002. Cellular Glutathione and thiols metabolism. *Biochemical pharmacology.* 64:1019 – 1026.
- Dinnyes, A.; Carolan C. et al. 1995. In Vitro survival of IVF bovine embryos frozen or vitrified by techniques suitable for direct transfer. *Theriogenology.* 43: 197.
- Dinnyes, A.; Liu, J. and Nedambale, TL. 2007. Novel gamete storage. *Reprod. Fert. Dev.* 19: 719 – 731.
- Dobrinsky, J. 2002. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology.* 57: 285 – 602.
- Elaheh, J.; Assadollahpour. M. et al. 2013. The dietary fatty acids and their effects on reproductive performance of ruminants. *Euro. J. Exp. Bio.* 3 (6): 95 - 97.
- Evans, M.; Lin, X. et al. 2002. Trans – 10, cis – 12 conjugated linoleic acid increases fatty acid oxidation in 3t3 – L1 preadipocytes. *J. Nutr.* 132 (3): 450 – 455.
- Eyestone, W.H. and First, N. 1989. Co-culture of early cattle embryo to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.* 85: 715 – 720.
- Embryo Transfer Newsletter. IETS, A publication of the international embryo transfer society. December 2015.
- Fair, T.; Lonergan, P. et al. 2001. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of blastocyst production. *Mol. Reprod. Dev.* 58(2): 186 -195.
- Forouzanfar M.; Sharafi, M. et al. 2010. In vitro comparison of egg yolk – based and soybean lecithin – based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology.* 73: 480 – 487.

- Fukuda, Y.; Ichiwaka, M. et al. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.* 42: 114 – 119.
- Fukui, Y.; Glew, A.M. et al. 1988. Ram – specific effects on in vitro fertilization and cleavage of sheep oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Fert.* 82: 337 – 340.
- Fukui, Y.; McGown, L.T. et al., 1991. Factors affecting the in vitro development to blastocyst of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fert.* 92: 125 – 131.
- Furnus, CC.; De Matos, DG. et al. 1996. Stimulation of glutathione synthesis of In Vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol. Reprod. Dev.* 45(4): 451 -457.
- Galli, C.; Crotti, G. et al. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology.* 55: 1341 – 1357.
- Goldman, S.; Dirnfeld, M. et al. 1993. The effect of epidermal growth factor and differentiation of mouse preimplantation embryos In Vitro. *Human Reprod.* 13: 2231 – 2233.
- Gordon, I. 2003. *Laboratory Production of cattle Embryos*, 2<sup>nd</sup> edition. *Biotechnology in Agriculture Series. No.27.* CABI Publishing. pp.: 258 – 260.
- Grazul – Biliska, AT.; Choi, JT. et al. 2003. Effects of Epidermal Growth Factor on early embryonic development after In Vitro fertilization of oocytes collected ewes treated with follicle stimulating hormone. *Theriogenology.* 59: 1449 – 1457.
- Greve, T.; Madison, V. et al., 1993. In vitro production of bovine embryos. A progress report and the consequences on the genetic upgrading of cattle populations. *Anim. Reprod. Sci.*, 33: 51 – 69.
- Guerin, P.; El Moutassim, S. and Menezo Y. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre – implantation embryo and its surroundings. *Human Reprod. Update.* 7 (2): 175 – 189.

- Guler, A.; Paulin, P. et al. 2000. Effect of growth factors, EGF and IGF – I and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. *Theriogenology*. 54(2): 209 – 218.
- Guo, L.; Tang, B. et al., 2009. Effects of 17 -  $\beta$  - estradiol and cisteamine on in vitro maturation of beef cattle oocytes. *Reprod. Fert. Dev.*. Publicado on-line: 08 de diciembre de 2009.
- Gutierrez, J. 2006. ¿Qué sabe usted acerca de radicales libres?. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37 (4): 69 – 73.
- Gutteridge, JM. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem*. 41: 1819 – 1828.
- Guyader – Joly, C.; Menezo, Y., et al. 1999. Effect of lecithin on in vitro and in vivo survival of in vitro produced bovine blastocysts after cryopreservation. *Theriogenology*, 52: 1193 – 1202.
- Haggarty, P.; Wood, M. et al. 2006. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. *Human Reprod*. 21 (3): 766 – 773.
- Hanada, S.; Kumemura, H. et al. 2007. Oxidative stress induces the endoplasmic reticulum stress and facilitates inclusion formation in cultured cells. *J. Hepatol*. 47: 93 – 102.
- Harper, K. and Brackett, G. 1993. Bovine Blastocyst Development after In Vitro maturation in a defined medium with Epidermla Growth Factor and low concentration of Gonadotropins. *Biol. Reprod*. 48: 409 – 416.
- Harris, RC.; Chung, E. et al. 2003. EGF receptor ligands. *Exp. Cell. Res*. 284 (1): 2 – 13.
- Hasler, JF.; Henderson, WB. et al. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*. 43: 141 – 152.
- Hasler, JF. 1998. The current status of oocyte recovery In Vitro embryo production and embryo transfer in domestic animals with an emphasis on the bovine. *J. Anim. Sci*. 76(3): 52 – 74.

- Hasler, JF. 2002. The freezing, thawing and transfer of cattle embryos. Factors affecting calf crop. *Biotechnology of Reproduction*. Ed. CRC. USA. pp.: 119 – 129.
- Hasler, JF. 2010. Synthetic media for culture, freezing and vitrification of bovine embryos. *Reprod. Fert. Dev.* 22: 119 – 125.
- Havlicek, V.; Lopatarova, M. et al. 2005. In vivo culture of bovine embryos and quality assessment of In Vivo vs. In Vitro produced embryos. *Vet. Med. - Czech.* 50 (4): 149 - 157.
- Heldin, CH. and Westermark, B. 1989. Growth Factors as transforming proteins. *Eur. J. Biochem.* 184: 487 – 496.
- Hernandez – Fonseca, HJ.; Palomares – Naveda, R. et al. 2004. Effect of Epidermal Growth Factor (EGF) during oocyte maturation on In Vitro production of Bovine embryos. *Reprod. Fert. Dev.* 16 (2): 257. [Dx.doi.org/10.1071/RDv16n1Ab373](https://doi.org/10.1071/RDv16n1Ab373).
- Herrler, A.; Kruschec, C. and Beier, H. 1998. Insulin and insulin like growth factor – I promote rabbit blastocysts development and prevent apoptosis. *Biol. Reprod.* 59: 1302 – 1310.
- Heyman, Y. and Ménézo, Y., 1987. Interaction of trophoblastic vesicles with bovine embryos developing in vitro. *The Mammalian Preimplantation embryo*. Bavister BD Ed., Plenum Press, New York. pp.: 175 – 191.
- Holm, P. and Callesen, H. 1998. In vivo versus In vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod. Nutr. Dev.* 38: 579 – 594.
- Holm, P. and 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.
- Hoschi, S.; Kozawa, M. et al. 1996. In Vitro maturation and transmission electron microscopic observation oocytes after vitrification. *Cryobiology*. 33: 300 – 310.

- Ikeda, K.; Takashi, Y. and Katagiri, S. Effect of medium change on the development of in vitro matured and fertilized bovine oocytes cultured in medium containing aminoacids. *J. Veterinary Medical Science*. 62(1): 121 – 123.
- Imai, K.; Kobayashi, S. et al. 1997. Cryopreservation of bovine embryos obtained by in vitro culture of IVM – IVF oocytes in the presence of linoleic acid – albumin. *Theriogenology*, 47: 347.
- IRAC – BIOGEN. Manual de procedimientos de congelado de embriones.
- Iwasaki, S.; Yoshida, N. et al. 1990. Morphology and proportion of the inner cell mass of bovine blastocysts fertilized In Vitro and In Vivo. *J. Reprod. Fert.* 90: 279 – 284.
- Iwata, H.; Akamatsu, S. et al. 1998. Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. *Theriogenology*. 50: 365 – 375.
- Kajihara, Y.; Blakewood, E.C. et al., 1991. In vitro maturation of follicular oocytes obtained from calves (Abstract). *Theriogenology*, 35(1): 220.
- Kane, MT.; Morgan PM and Coonan, C. 1997. Peptide growth factors and preimplantation development. *Hum. Reprod. Update*. 3: 137 – 157.
- Khurana, NK. and Niemann, H. 2000. Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocyst derived “in vitro” or “in vivo”. *Theriogenology*, 54: 313 – 326.
- Kobayashi, K.; Tagaki, Y. et al. 1992. Development of early bovine embryos to the blastocyst stage in serum - free conditioned medium from bovine granulosa cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 28: 255 – 259.
- Kobayashi, K.; Yamashita, S. et al. 1994. Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor – alpha on in vitro maturation of cumulus cell – enclosed bovine oocytes in a defined medium. *J. Reprod. Fert.* 100: 439 – 446.
- Kosower, NS. and Kosower, EM. 1983. Glutathione and cell membrane thiol status functions of glutathione. *Larson. A. Nueva York Editorial. Raven*. pp.: 307 – 315.

- Laowtammathron, C.; Lorthongpanich, C. et al. 2005. Factors affecting cryosurvival of nuclear – transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid – albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. *Theriogenology*. 64: 1185 – 1196.
- Larocca, C.; Fila, S. et al. 1998. Viabilidad de embriones bovinos producidos In Vitro congelados – descongelados en dos medios de cultivo con  $\beta$  – mercaptoetanol. *Arch. Zootec*. 47: 3 – 10.
- Leao, BCS.; Frigoni, NASR. et al. 2015. Supplementation with linolenic acid, L – Carnitine, alone or associated, during IVM resulted in decrease of ROS levels and apoptotic index of Bovine In Vitro produced embryos. *Reprod. Fert. Dev.* 28(2): 232 – 233. [dx.doi.org/10.1071/RDv28n2Ab203](https://doi.org/10.1071/RDv28n2Ab203).
- Lee, ES. and Fukui, Y. 1995. Effect of various growth factors in a defined medium on in vitro development of bovine embryos matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*. 44: 71 – 83.
- Leibo, S.P. and Loskutoff N.M. 1993. Cryobiology of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology*, 39: 81 – 94.
- Leibo, SP. and Songsasen, N. 2002. Cryopreservation of gametes and embryos of nondomestic species. *Theriogenology*. 57: 303 - 326.
- Li, J.; Foote, RH. and Simkin, M. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine or superoxide dismutase. *Biol. Reprod.* 48(1): 33 – 37.
- Lonergan, P.; Carolan, C.; Van Langendonck, A. et al. 1996. Role of Epidermal Growth Factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol. Reprod.* 54: 1420 – 1429.
- Lonergan, P. and Fair, T. 2008. In Vitro produced bovine embryos dealing with the warts. *Theriogenology*. 69: 17 – 22.
- Looney, CR. and Pryor JH. 2009. Practical applications of new research information in the practice of bovine embryo transfer. *Reprod. Fert. Dev.* 22 (5305): 145 – 150.

- Lu, K. H.; Gordon, I. et al. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *The Vet. Record.* 121: 259 – 260.
- Luciano, AM.; Modina, S. et al. 2004. Role of intracellular cyclic adenosine 3'- 5'-monophosphate concentration and oocyte – cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during In Vitro maturation of bovine oocyte. *Biol. Reprod.* 70: 465 – 472.
- Ludwing, M. and Al-Hassani, S. 1999. New aspects of cryopreservation of oocytes and embryos in assisted reproduction and future perspectives. *Human Reproduction*, Vol. 14 (Suppl. 1), pp: 162 – 185.
- Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones. Guía de procedimientos e información general para el uso de la tecnología de la transferencia de embriones con especial énfasis en los procedimientos sanitarios. Tercera edición. Editado por: Stringfellow, DA., Meidel, SM. 2000.
- Mapletoft, RJ. 2013. History and perspectives on bovine embryo transfer. *Anim. Reprod.* 10 (3): 168 – 173.
- Martín – Romero, FJ.; Miguel – Lasobras, EM. et al. 2008. Contribution of the culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. *Reprod. Biomed. Online.* Nov. 17(5): 652 – 661.
- Martínez, M.; Barrado, DA. et al. 2006. Conceptos actuales del metabolismo del glutatión. Utilización de isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.* 40 (1): 45 -54.
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247: C125 – 142.
- Mc Evoy, TG.; Coull, GD. et al. 2000. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J. Reprod. Fert.* 118: 163 – 170.



- Meirelles, FV.; Caetano, AR. et al. 2004. Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 82: 13 – 20.
- Meister, A. and Tate, SS. 1976. Glutathione and related gamma – glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Annual Review of Biochemistry.* 45: 559 – 604.
- Meister, A.; Tate, SS and Grau, EM. 1979. Conversion of glutathione to glutathione disulfide by cell membrane-bound oxidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76 (6): 2715 – 2719.
- Memili, E. and First, NL. 2000. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared other species. *Zygote.* 8: 87 – 96.
- Menezo, YJ. 2004 a. Cryopreservation of IVF embryos: Wich stage?. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 113 (1): 528 – 532.
- Menezo, YJ. 2004 b. Blatocyst Freezing. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 115 (1): 512 – 515.
- Meryman, HT. 1971. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. *Cryobiology.* 8: 489-500.
- Mermillod, P.; Vansteenbrugoe, A. et al. 1993. Characterization of the embryo trophic activity of exogenous protein – free oviduct – conditioned medium used in culture of cattle embryos. *Biol. Reprod.* 49: 582 – 587.
- Merton, JS.; Gerritsen, M. et al. 2004. Effect of Cysteamine during In Vitro maturation on further embryonic development and posttyhaw survival of IVP Bovine embryos. *Reprod. Fert. Dev.* 16 (2): 279 – 280.
- Merton, JS.; Landman, B. and Mullaart, E. 2005. Effect of cysteamine during In Vitro maturation of OPU derived Bovine oocytes on further In Vitro embryonic development and pregnancy rate. *Reprod. Fert. Dev.* 18(2): 251. [dx.doi.org/10.1071/RDv18n2Ab287](https://doi.org/10.1071/RDv18n2Ab287).

- Merton, JS.; Knijn, HM. et al. 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 (4): 365 – 371.
- Mucci, N.; Aller, J. y otros. 2005. Criopreservación de embriones bovinos. *Taurus*, Bs. As.; 7 (26): 20 – 35.
- Mucci, N.; Aller, J. et al. 2006. Effects of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*. 65 (8): 1551 – 1562.
- Mtango, NR.; Suzuki, T. et al. 2003. Growth factors and growth hormone enhance In Vitro embryo production and post – thaw survival of vitrified bovine blastocyst. *Theriogenology*. 59 (5 – 6): 1393 – 1402.
- Mullen, S.F.; Agca, Y. et al. 2004. The effect of osmotic stress on the metaphase II spindle of human oocytes and the relevance to cryopreservation. *Human Reproduction*. 19 (5). pp: 1148 – 1154.
- Murphy, MP. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical J*. 417 (1): 1 – 13.
- Nagai, T. The improvement of in vitro maturation system for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*. 55: 1291- 1301.
- Nömm, M.; Mark, E. et al. 2015. Produced in serum – free in vitro production system. *Reprod. Fert. Dev*. 28(2): 227 – 228. doi/10.1071/RDv28n2At193.
- Oyamada, T. and Fukui, Y. 2004 a. Oxygen tension and medium supplements for In Vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *J. Reprod. Dev*. 50 (1): 107 -117.
- Oyamada, T. and Fukui, Y. 2004b. Additional effect of epidermal growth factor during In Vitro maturation for individual bovine oocytes using a chemically defined medium. *Zygote*. 12 (2): 143 – 150.

- Palomares – Naveda, R.; Hernández – Fonseca, H. y Brackett, B. 2004. Efecto del Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) durante la maduración de oocitos sobre la producción In Vitro de embriones bovinos. *Revista Científica, FCV – LUZ / Vol. XIV. No. 2: 162 – 167.*
- Papa, FO.; Felicio, GB. et al. 2011. Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. *Anim. Reprod. Sci. 129: 73 -77.*
- Park, YS. and Lin, YC. 1993. Effect of epidermal growth factor (EGF) and defined simple media on in vitro bovine oocyte maturation and early embryonic development. *Theriogenology. 39(2): 475 – 484.*
- Parrish, J.J.; Susko – Parrish J.L. et al. 1988. Capacitation of bovine spermatozoa by heparin. *Biol. Reprod., 38: 1171 – 1180.*
- Pereira, RM.; Baptista, MC. et al. 2007. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans – 10, cis -12 conjugated linoleic acid (10 t, 12 c CLA). *Anim. Reprod. Sci. 98: 292 – 301.*
- Pereira, RM.; Carvahalhais, I. et al. 2008. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by 10 t, 12 c CLA supplementation during in vitro embryo culture. *Anim. Reprod. Sci. 106: 322 – 332.*
- Pereira, R.; Barbosa, N. et al. 2014. Trans – 10, cis – 12 conjugated linoleic acid reduces neutral lipid content and may affect cryotolerance of In Vitro produced crossbred bovine embryos. *J. Anim. Sci and Biotechnology. 5 (1): 33.*
- Piccinato, CA.; Sartori, R. et al. 2010. In vitro and in vivo analysis of fatty acid effects on metabolism of 17  $\beta$ -estradiol and progesterone in dairy cows. *J. Dairy Sci. 93 (5): 1934 – 1943.*
- Pollard, JW and Leibo SP. 1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology. 41: 101 – 106.*

- Pomar, FJ.; Teerds, KJ. et al. 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.
- Prochazka, R.; Srsen, V. et al. 2000. Developmental regulation of effect of epidermal growth factor on porcine oocyte-cumulus cell complexes: nuclear maturation, expansion and F-actin remodeling. *Mol. Reprod. Dev.* 56: 63 – 73.
- Pryor, JH.; Looney, CR. et al. 2007. The effect of lipid segregation with or without zona pelucida lasser drilling on post – thaw embryo development of in vitro – produced bovine embryos. *Reprod. Fert. Dev.* 20 (1): 125 – 126.
- Pugh, PA.; Ankersmit. AE. et al. 1998. Cryopreservation of In Vitro – produced bovine embryos: Effects of protein type and concentration during freezing or of liposomes during culture on post – thaw. *Theriogenology*. 50 (3): 495 – 506.
- Purohit, NA.; Brady, MS. and Sharma, SS. 2005. Influence of epidermal growth factor and insulin – like growth factor I on nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complexes in serum free media and their subsequent development in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 87(3 -4): 229 – 239.
- Qu, J.; Godin, PA. et al. 2000. Distribution and epidermal growth factor receptor expression of primordial follicles in human ovarian tissues before and after cryopreservation. *Human Reproduction*. 15(2): 302 – 310.
- Reed, M.; Hamic A. et al. 2009. Soy lecithin replaces egg yolk for cryopreservation of human sperm without adversely affecting postthaw motility, morphology, sperm DNA integrity, or sperm binding to hyaluronate. *Fertility and sterility*. 92 (5): 1787 – 1790.
- Reis, A.; Mc Callum, GJ. et al. 2002. Vitamin E supplementation improves bovine embryo development in vitro. *Reprod. Abstract series*. 28.15 -16.
- Rios, MC. 2003. El estrés oxidativo y el destino celular. *Rev. Química viva* 2(1). [www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar). Revista Electrónica de Ciencia y Educación.

- Rieger, D.; Loskutoff, NM and Betteridge, KJ. 1992. Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced in vitro. *Reprod. Fert. Dev.* 4: 547 – 557.
- Rieger, D.; Luciano, AM. et al. 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. *J. Reprod. Fert.* 112: 123 – 130.
- Rizos, D.; Lonergan, P., Boland, MP. et al. 2002. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: Implications for Blastocysts quality. *Biol. Reprod.* 66: 589 – 595.
- Rizos, D.; Gutierrez – Adan A.; Perez – Garnelo, S. et al. 2003. Bovine Embryo Culture in the presence or absence of serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* 68: 236 – 243.
- Rizos, D.; Clemente, M. et al. 2008. Consequences of in vitro culture condition on embryo development and quality. *Reprod. Dom. Anim.* 43 (4): 44 – 50.
- Rocha - Frigoni, NAS.; Leao, BCS. Nogueira, E. et al. 2013. Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and apoptosis status are not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos produced in vitro in the presence of antioxidants. *Reprod. Fert. Dev.* 26 (6): 797 – 805.
- Saeki, K.; Hoshi, M. et al. 1991. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol. Reprod.* 44: 256 – 260.
- Sagakuchi, M.; Dominkop, T. et al. 2000. A combination of EGF and IGF – 1 accelerates the progression of meiosis in bovine follicular oocytes in vitro and fetal calf serum neutralizes the acceleration effect. *Theriogenology.* 54: 1327 – 1342.
- Sagakushi, M.; Dominko, T. et al. 2002. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors in vitro. *Reproduction.* 123: 135 – 142.

- Sanches, BV.; Lunardelli, PA.; Tannura, JH. et al. 2016. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. *Theriogenology* 85: 1147 – 1151.
- Saragusty, J. and Arav, A. 2011. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*. 141: 1 – 19.
- Seidel, GE. Jr., 2006. Modifying oocytes and embryos to improve the cryopreservation. *Theriogenology*, 65: 228 – 235.
- Serapiao, R.V.; Ferreira W.F. et al. 2005. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. *Revista Brasileira de ciéncia veterinária*. 12 (1 - 3): 58 – 61.
- Silva, D.S.; Pereira, R.B. et al., 2010. In vitro production of *Bos taurus indicus* embryos with cysteamine. *Anim. Reprod.* 7 (1): 29 – 34.
- Sirard, MA. 2011. Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. *J. Assits. Reprod. Genet.* doi 10.1007/s10815-011-9554-4.
- Sirisathien, S.; Hernandez – Fonseca, HJ. and Brackett, BG. 2003. Influences of epidermal growth factor and insulin – like growth factor – I on bovine blastocyst development in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 77: 21 – 32.
- Sudano, MJ.; Rascado, TD. et al. 2016. Lipidome signatures in early bovine embryo development. *Theriogenology*. 86 (2): 472 – 484.
- Sutton, ML. 2003. Effect of In Vivo and In Vitro environments on the metabolism of the cumulus – oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reprod. Update*. 9 (1): 35 – 48.
- Takahashi, M.; Nagai, T.; Hamano, S. et al. 1993. Effect of thiol compounds on in vitro development and intracelular glutathion content of bovine embryos. *Biol. Reprod.* 49: 228 – 232.
- Takahashi, M. et al. 2002. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in vitro cultured bovine embryos by COMET assay. *Theriogenology*. 53(3): 365.

- Tamargo – Santos, B.; Herrera – Belén, S y otros. 2011. Obtención de fosfolípidos a partir de la lecitina de soya (*Glicine max L*) para usos biomédicos. *Revista Cubana de Química*. Vol. XXIII. No. 3: 5 -14.
- Tarazona, AM.; Oliveira – Angel, M. y Lenis YY. 2010. Rol de la mitocondria y el estrés oxidative en el bloqueo del desarrollo de embriones Bovinos producidos In Vitro. *Arch. Med. Vet.* 42 (3).
- Thompson JG.; Partridge, RJ. et al. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by In Vitro derived bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 106: 299 – 306.
- Tirone, E.; D’Alessandris, C. et al. 1997. Hyaluronan synthesis by mouse cumuls cells regulated by interactions between follicle – stimulating hormone (or epidermal growth factor) and soluble oocyte factor (or transforming growth factor beta I). *J. Biol. Chem.* 272: 4787 – 4794.
- Turrens, JF. 2003. Mithochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology.* 552 (2): 335 – 344.
- Ushijima, H.; Akiyama, K. and Tajima, T. 2008. Transition of cell numbers in bovine preimplantation embryos: in vivo collected and in vitro produced embryos. *J. Reprod. Dev.* 54(4): 239 – 243.
- Van Soom, A.; Van Vlaenderen, et al. 1992. Comparaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology.* 38: 95 – 919.
- Van Soom, A.; Yuan, YQ. et al. 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 Wagendonk – de L., and Haring, RM. 2000. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology.* 54: 57 – 67.

- Velasquez, MA. 2011. The role of nutritional supplementation of the outcome of superovulation in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 126: 1 – 10.
- Venerao Gutiérrez, JR. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cub. Med. Milit.* 31 (2): 126 – 133.
- Viana, JHM.; Siqueira, LGB. et al. 2012. Features and perspectives of the Brazilian In Vitro Embryos Industry. *Anim. Reprod.* 09: 12 – 18.
- Vidal. AH.; Batista, AM. et al. 2012. Soybean lecithin – based extenders as an alternative for goat sperm cryopreservation. *Small ruminant research.*
- Viuff,D.; Palsgaard, A. et al. 2002. Bovine embryos contain a higher proportion of polyploidy cells in the trophectoderm than in the embryonic disc. *Mol. Reprod. Dev.* 62: 483 – 488.
- Waleed, F.; Wathes, C. and Fouladi – Nasha A. 2010. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. *Reproduction.* 139: 979 – 988.
- Woods, J.; Benson D. et al. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology.*, 48: 146 – 156.
- Wrenzycki, C.; Wells, D. et al. 2001. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocyst. *Biol. Reprod.* 65: 309 – 317.
- Yang, CY. and Zheng, HY. 2012. The impact of linolenic acid on in vitro development of buffalo embryos. *Buffalo Bulletin.* 32: 432 – 435.
- Yoshida, Y.; Miyamura, M. et al. 1998. Expression of growth factor ligand and their receptor mRNAs in bovine ova during in vitro maturation and after fertilization in vitro. *The Journal of veterinary medical science / The Japanese Society of Veterinary Science.* 60: 549 – 554.
- Younis, A.L.; Brackett, B.G. et al., 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete. Res.* 23: 189 – 201.



- Zeron, Y.; Ocheretny, A., et al. 2001. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reprod.* 121: 447 – 454.
- Zeron, Y.; Slan D. and Arav, A. 2002. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 61 (2): 271 – 278.
- Zuelke, K.A. and Brackett, B.G. 1990. Luteinizing hormones enhanced in vitro maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. *Biol. Reprod.* 43: 784 – 787.
- Zullo, G.; Albero, G. et al. 2015. L – ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine In Vitro – produced embryos. *Theriogenology.* 3: 1 – 10.