

Quimeras transitorias en la producción de embriones bovinos

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
Área Ciencias Agropecuarias*

María Inés Hiriart

Licenciada en Biotecnología - Universidad Nacional de Quilmes - 2008

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Agronomía,
Universidad de Buenos Aires, Capital Federal, Argentina.



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO DE TESIS DOCTORAL

Director de tesis

Dr. Daniel Felipe Salamone

Médico Veterinario (Universidad de Buenos Aires, Argentina)
Ph.D (Universidad de Massachusetts, Estados Unidos)

Consejero de estudios

Dr. Rafael Fernández-Martín

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Sevilla, España)
Ph.D (Universidad de Sevilla, España)

JURADO DE TESIS DOCTORAL

Dr. Ricardo Alberio

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Balcarce, Buenos Aires, Argentina.

Dr. Mariano Buffone

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), Buenos Aires, Argentina.

Dr. Rodolfo Luzbel De la Sota

Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Calificación: Sobresaliente

Buenos Aires, 13 de marzo de 2014

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

María Inés Hiriart
Licenciada en Biotecnología
(Universidad Nacional de Quilmes)

*A Ulises, Herminda, Yiyo y Lola,
por ser mis ejemplos de vida.*

AGRADECIMIENTOS

- ✓ A mi director, el **Dr. Daniel Salamone**, por haberme abierto las puertas para trabajar con su equipo en su laboratorio. Gracias Daniel por enseñarme TANTO, ya sea a nivel profesional como personal. Gracias por soportar mis caprichos, mis malos humores e inestabilidades, por todas las charlas y los consejos. Gracias especialmente por transmitirme esta gran pasión y entusiasmo por la ciencia, que me acompañarán a lo largo de la vida. Pero principalmente gracias por confiar en mí y por armar este grupo alucinante de compañeros y amigos que trabajamos y compartimos juntos.

- ✓ A **mis compañeros**, pero ante nada mis amigos del laboratorio. Gracias a los que estuvieron y a los que están, porque me ayudaron no solo a trabajar mejor sino a crecer como persona. Gracias por compartir cientos de repeticiones de mis experimentos, correcciones y discusiones. Gracias a Romi, Naty y Cauchi, mi **Bovine Team!** Gracias Carlita por escucharme tanto. Gracias Andrés, Caro, Lu, Flor, Rama, Adri, Bele, Marian, Geri por haber compartido miles de horas y algunos viajes juntos. Y gracias Fede por ser el modelo a seguir. Gracias por la amistad.

- ✓ A mi co-director, el **Dr. Rafael Fernández-Martín**, por sus constantes críticas, pero también su buena predisposición. Gracias por la paciencia.

- ✓ Al **Dr. Mario Nigro** y su equipo, gracias por la confianza.

- ✓ A **papá**, por haberme hecho a su imagen y semejanza, por haberme hecho una Hiriart con todo lo que eso representa y por haber confiado en mí. Gracias por todo. Y a **mamá**, por haberme inculcado la cultura del trabajo, del esfuerzo y la importancia de perseguir los sueños, por haber confiado en mí cuando más lo necesité.

- ✓ A mis hermanos, **Juan y Agus** por acompañarme en esta etapa, porque sin ellos no hubiese crecido igual. A **Euge**, por apoyarme y confiar tanto en mí. Y a **Totito**, por ser la alegría de todos.

- ✓ A mis amigos, de verdad una segunda familia: Wapi, Vero, Flor, Cin y todas las polakas, Delfi, Magui, Seba, Fichi, Santi, Ana, Marito. Gracias por aceptarme como soy.

- ✓ A **Yiyo y Lola** por ser tan abuelos, por cuidarme tanto siempre.

- ✓ Y especialmente gracias a mis abuelos **Ulises y Herminda**, por ser los del campo, mis papás abuelos más lindos del mundo. Porque son todo para mí, porque aún los necesito y los extraño.

“Al infinito... y más allá!”

Buzz Lightyear
en *Toy Story*

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE ESTA TESIS

- **PREMIOS Y DISTINCIONES**

2013 – Premios CiTA (Centro Internacional de Innovación en Tecnología Agropecuaria) a la Innovación Tecnológica. Mención de honor: BARBERIS Y CAVALLERO S.A. Rubro Tecnología aplicada a la producción de carne y leche. Manejo. **Trabajo:** Sistema de producción, multiplicación y crioconservación de embriones bovinos generados por fertilización *in vitro* con semen sexado hembra.

- **PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS CON REFERATO**

Hiriart MI, Bevacqua RJ, Canel N, Fernández y Martín R, Salamone DF (2013). *Production of quimeric embryos by aggregation of bovine egfp 8-cell stage blastomeres with two-cell fused and asynchronous embryos*. Theriogenology; 80(4):357-364.

Bevacqua R, Canel N, **Hiriart MI**, Sipowicz P, Rozenblum GT, Vitullo A, Radrizzani M, Fernández y Martín R, Salamone D (2013). *I-SceI meganuclease improves transgene integration in bovine embryos*. Theriogenology; 80(2):104-113.

Canel NG, Bevacqua RJ, **Hiriart MI**, Salamone DF (2013). *Intracytoplasmic sperm injection (ISCI) mediated transgenesis using sexed sorted semen in bovine*. Acta Scientiae Veterinariae (suplemento). Resumen.

Hiriart MI, Canel NG, Gambini A, Bevacqua RJ, Camargo A LS, Salamone DF (2013). *Ooplasmic transfer on the development of zona-free IVF bovine embryos*. Acta Scientiae Veterinariae (suplemento). Resumen.

Canel N, Bevacqua R, **Hiriart MI**, Salamone D (2012). *Replication of somatic micronuclei in bovine enucleated oocytes*. Cell division; 7(1):23.

Bevacqua RJ, Pereyra-Bonnet F, Olivera R, **Hiriart MI**, Sipowicz P, Fernández y Martín R, Salamone DF (2012). *Production of IVF transgene-expressing bovine embryos using a novel strategy based on cell cycle inhibitors*. Theriogenology; 78(1):57-68.

Hiriart MI, Fernandes BF, Gambini A, Meirelles VF, Salamone DF (2012). *In vitro development of bovine zona-free clones reconstituted from over-expressing Oct4 or c-Myc somatic cells*. Acta Scientiae Veterinariae (suplemento); 650. Resumen.

Bevacqua RJ, Canel NG, Sipowicz P, **Hiriart MI**, Rozenblum GT, Radrizzani M, Vitullo A, Fernández y Martín R, Salamone DF (2012). *Detection of transgene signals and quantification of transgene copy number for meganuclease mediated transgenesis in bovine embryos*. Acta Scientiae Veterinariae (suplemento); 654. Resumen.

Salamone D, Bevacqua R, Pereyra Bonnet F, Gambini A, Canel N, **Hiriart MI**, Vichera G, Moro L, Jarazo M (2011). *Recent advances in micromanipulation and transgenesis in domestic mammals*. Acta Scientiae Veterinariae; 39 (Suppl 1): s285-s293. ISSN 1679-9216 (Online).

Canel N, Bevacqua R, **Hiriart MI**, Fernández y Martín R, Salamone DF (2011). *New strategy for transgenesis induction in bovine embryos from in vitro fertilization (IVF)*. Acta Scientiae Veterinariae (suplemento).

Salamone DF, Bertola ME, **Hiriart MI** (2011). *Células-troncoembrionárias em animais domésticos*. Revista Oembriao, SBTE. Año X, Edición 48; 26-38.

Bevacqua RJ, Canel N, **Hiriart MI**, Fernández y Martín R, Salamone DF (2011). *Meganuclease transgenesis in IVF and cloned bovine preimplantatory embryos*. Reprod. Fertil. Dev.; 24(1):113. Resumen.

Canel NG, Bevacqua RJ, **Hiriart MI**, Salamone DF (2011). *Replication of somatic micronuclei in bovine oocytes*. Reprod. Fertil. Dev.;24(1):112. Resumen.

Bevacqua RJ, Pereyra-Bonnet F, Olivera R, **Hiriart MI**, Fernández y Martín R, Salamone D (2010). *New IVF transgenesis strategy in bovine using cell cycle inhibitors incubation and mosaicism reversion by cloning*. Reprod. Fertil. Dev.; 23(1):107. Resumen.

Hiriart MI, Bevacqua RJ, Fernández y Martín R, Salamone D (2010). *Multiplication of eight cell embryos by aggregation of a single egfp-labeled blastomere with putative tetraploid embryos*. *Reprod. Fertil. Dev.*; 23(1): 168-169. Resumen.

Bevacqua RJ, Pereyra-Bonnet F, **Hiriart MI**, Fernández-Martín R, Salamone D (2010). *Production and partition of IVF derived transgenic embryos*. *Acta Scientiae Veterinariae*. 38(Supl 2): s677-s679. Resumen.

ÍNDICE GENERAL

Declaración de originalidad	i
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	v-vi
Publicaciones científicas derivadas de esta tesis	ix-xi
Premios y distinciones	ix
Publicaciones en revistas con referato	ix
Abreviaturas	xxi-xxiii
RESUMEN	xxv
Palabras clave	xxv
ABSTRACT	xxvii
Keywords	xxvii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1-26
1.1. Fisiología reproductiva de la hembra bovina	1
1.1.1. Desarrollo folicular y maduración ovocitaria	1
1.1.2. Fecundación y desarrollo embrionario	5
1.2. Biotecnologías reproductivas	8
1.2.1. Producción de embriones <i>in vivo</i>	9
1.2.1.a. <i>Superovulación</i>	9
1.2.1.b. <i>Inseminación artificial</i>	10
1.2.1.c. <i>Transferencia de embriones</i>	10
1.2.2. Producción de embriones <i>in vitro</i>	11
1.2.2.a. <i>Aspiración folicular</i>	11
1.2.2.b. <i>Fecundación in vitro</i>	12
1.2.2.c. <i>Clonación y transgénesis</i>	15
1.2.3. Multiplicación de embriones	16
1.2.4. Quimeras	18
1.2.4.a. <i>Complementación trofoblástica</i>	20
1.2.5. Criopreservación de embriones	22
1.2.5.a. <i>Congelamiento tradicional</i>	23
1.2.5.b. <i>Vitrificación</i>	23
1.3. Hipótesis	27

1.4. Objetivos	29-30
1.4.1. Objetivos generales	29
1.4.2. Objetivos específicos	29
1.4.2.a. <i>Objetivos específicos del Capítulo II</i>	29
1.4.2.b. <i>Objetivos específicos del Capítulo III</i>	29
1.4.2.c. <i>Objetivos específicos del Capítulo IV</i>	30
1.4.2.d. <i>Objetivos específicos del Capítulo V</i>	30
1.4.2.e. <i>Objetivos específicos del Capítulo VI</i>	30
CAPITULO II. FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i> CON SEMEN CONVENCIONAL	31-45
2.1. Resumen	32
2.2. Introducción	33
2.3. Diseño experimental	36
2.3.1. Experimento 1. FIV con semen convencional no sexado	36
2.3.2. Experimento 2. Transferencia de embriones producidos <i>in vitro</i> con semen convencional a partir de oocitos recuperados por OPU	36
2.4. Materiales y métodos	37
2.4.1. Productos químicos	37
2.4.2. Colección y maduración de oocitos de matadero	37
2.4.3. Estimulación de vacas donantes de oocitos para OPU	37
2.4.4. Recuperación de oocitos <i>in vivo</i> por OPU	38
2.4.5. Colección y selección de los oocitos recuperados por OPU	38
2.4.6. Fecundación <i>in vitro</i>	38
2.4.7. Cultivo <i>in vitro</i>	38
2.4.8. Sincronización de hembras receptoras	39
2.4.9. TE producidos por OPU y FIV	39
2.4.10. Análisis estadístico	39
2.5. Resultados	40
2.5.1. FIV con semen convencional no sexado	40
2.5.2. TE producidos <i>in vitro</i> con semen convencional a partir de oocitos recuperados por OPU	41
2.6. Discusión	42

CAPÍTULO III. PRODUCCIÓN DE EMBRIONES <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i> EMPLEANDO SEMEN SEXADO	47-64
3.1. Resumen	48
3.2. Introducción	49
3.3. Diseño experimental	53
3.3.1. Experimento 1. Recuperación de embriones <i>in vivo</i> producidos por SOV e IA con semen sexado hembra	53
3.3.2. Experimento 2. FIV con semen sexado hembra	53
3.4. Materiales y métodos	54
3.4.1. SOV de hembras donantes de embriones para IA	54
3.4.2. IA con semen sexado hembra	54
3.4.3. Colecta de embriones	54
3.4.4. Análisis de la producción de embriones <i>in vivo</i> con semen sexado hembra	55
3.4.5. Colección y maduración de oocitos de matadero	55
3.4.6. Fecundación <i>in vitro</i>	55
3.4.7. Cultivo <i>in vitro</i>	55
3.4.8. Análisis estadístico	56
3.5. Resultados	57
3.5.1. Recuperación de embriones <i>in vivo</i> producidos por SOV e IA con semen sexado hembra	57
3.5.2. FIV con semen sexado hembra	58
3.6. Discusión	62
CAPÍTULO IV. VITRIFICACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS LIBRES DE ZONA PELÚCIDA	65-75
4.1. Resumen	66
4.2. Introducción	67
4.3. Diseño experimental	69
4.3.1. Vitricación de embriones LZP	69
4.4. Materiales y métodos	70
4.4.1. Colección y maduración de oocitos de matadero	70
4.4.2. Fecundación <i>in vitro</i>	70
4.4.3. Remoción de las células del cúmulus y la ZP	70
4.4.4. Cultivo <i>in vitro</i>	70
4.4.5. Vitricación de embriones con ZP y LZP	70
4.4.6. Calentamiento de embriones con ZP y LZP	71

4.4.7. Cultivo embrionario y evaluación de la reexpansión post-calentamiento	71
4.4.8. Análisis estadístico	71
4.5. Resultados	72
4.5.1. Vitricación de embriones LZP	72
4.6. Discusión	74
CAPÍTULO V. TRANSFERENCIA DE OOPLASTOS A PRESUNTOS CIGOTOS BOVINOS DE FIV LPZ	77-101
5.1. Resumen	78
5.2. Introducción	79
5.3. Diseño experimental	82
5.3.1. Experimento 1. Producción de embriones reconstruidos por TO de uno (1+) o dos (2+) ooplastos en presuntos cigotos de FIV	82
5.3.2. Experimento 2. Desarrollo de blastómeras individuales (BI) de los embriones sujetos a TO	84
5.3.3. Experimento 3. Vitricación y TE de embriones producidos por TO	84
5.4. Materiales y métodos	85
5.4.1. Colección y maduración de oocitos	85
5.4.2. Fecundación <i>in vitro</i>	85
5.4.3. Remoción de las células del cúmulus y la ZP	85
5.4.4. Generación de ooplastos por enucleación	85
5.4.5. Transferencia de ooplastos por fusión	85
5.4.6. Tinción para recuento celular	86
5.4.7. Desarrollo de blastómeras individuales	86
5.4.8. Cultivo embrionario	86
5.4.9. Vitricación de embriones LZP	87
5.4.10. Sincronización de hembras receptoras	87
5.4.11. Calentamiento de embriones	87
5.4.12. Transferencia de embriones vitricados y calentados	87
5.4.13. Análisis estadístico	88
5.5. Resultados	89
5.5.1. Producción de embriones reconstruidos por TO de uno (1+) o dos (2+) ooplastos en presuntos cigotos de FIV	89
5.5.2. Desarrollo de blastómeras individuales de los embriones sujetos a TO	95
5.5.3. Vitricación y TE de embriones producidos por TO	95
5.6. Discusión	96

CAPÍTULO VI. PRODUCCIÓN DE EMBRIONES QUIMÉRICOS POR AGREGACIÓN DE CÉLULAS EGFP DE EMBRIONES EN ESTADIO DE 8 CÉLULAS CON EMBRIONES FUSIONADOS EN ESTADÍO DE 2 CÉLULAS Y EMBRIONES ASINCRÓNICOS	103-122
6.1. Resumen	104
6.2. Introducción	105
6.3. Diseño experimental	107
6.3.1. Experimento 1. Determinación de las mejores condiciones para la fusión de embriones bovinos en estadio de 2 células	107
6.3.2. Experimento 2. Determinación de la ploidía de embriones fusionados en estadio de 2 células	107
6.3.3. Experimento 3. Agregación sincrónica y asincrónica de blastómeras expresando <i>egfp</i> con embriones fusionados o no fusionados y localización de la expresión del transgén	107
6.4. Materiales y métodos	109
6.4.1. Colección y maduración de oocitos	109
6.4.2. Fecundación <i>in vitro</i>	109
6.4.3. Remoción de las células del cúmulus	109
6.4.4. Producción de vesículas e incubación con ADN exógeno	109
6.4.5. Electrofusión y cultivo <i>in vitro</i> de embriones fusionados	110
6.4.6. Análisis de la carga cromosómica de los embriones fusionados	110
6.4.7. Separación y selección de blastómeras expresando <i>egfp</i>	111
6.4.8. Agregación	111
6.4.9. Cultivo de embriones <i>in vitro</i>	112
6.4.10. Análisis estadístico	112
6.5. Resultados	113
6.5.1. Determinación de las mejores condiciones para la fusión de embriones bovinos en estadio de 2 células	113
6.5.2. Determinación de ploidía de los embriones fusionados en estadio de 2 células	114
6.5.3. Agregación sincrónica (S) y asincrónica (AS) de embriones fusionados (F) o no fusionados (NF) con blastómeras expresando <i>egfp</i> y localización de la expresión del transgén	115
6.6. Discusión	117
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	123-128
7.1. Conclusiones generales	123
7.2. Perspectivas	126

8. Referencias bibliográficas

129-158

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO II

Tabla 1. Resultados globales de la fertilización <i>in vitro</i> para los toros analizados	40
Tabla 2. Transferencia de embriones producidos <i>in vitro</i> con semen convencional y oocitos recuperados por OPU	41

CAPÍTULO III

Tabla 3. Producción de embriones <i>in vivo</i> por SOV e IA con semen sexado hembra	57
Tabla 4. Producción de embriones <i>in vitro</i> por FIV con semen sexado hembra	60

CAPÍTULO IV

Tabla 5. Reexpansión de blastocistos bovinos generados por FIV vitrificados con ZP y LZP	72
--	----

CAPÍTULO V

Tabla 6. Determinación del tamaño celular	89
Tabla 7. Clivaje y número de células en el día 2 de los embriones de los embriones producidos por TO	90
Tabla 8. Tasas totales de clivaje a día 2 y producción de blastocistos en el día 7	91
Tabla 9. Asociación entre el número de células en el día 2 y la formación de blastocistos en el día 7	92
Tabla 10. Número de células de los blastocistos obtenidos	93
Tabla 11. Desarrollo de blastómeras individuales (BI)	95

CAPÍTULO VI

Tabla 12. Desarrollo <i>in vitro</i> de embriones bovinos en estadio de 2 células fusionados con diferentes intensidades de campo eléctrico	114
Tabla 13. Agregación embrionaria para la generación de quimeras transitorias	116

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Foliculogénesis	4
Figura 2. Crecimiento y diferenciación de blastocistos bovinos preimplantatorios	7
Figura 3. Esquema del procedimiento de FIV con semen sexado	14
Figura 4. Quimera de la mitología griega	18

CAPÍTULO III

Figura 5. Proceso de sexado a través de citometría de flujo y clasificación de células	50
Figura 6. Fotografía obtenida a través de microscopía electrónica de barrido mostrando las diferencias de tamaño entre los cromosoma X e Y	51
Figura 7. Variabilidad por toro en SOV e IA con semen sexado hembra	58
Figura 8. Variabilidad por toro en FIV con semen sexado hembra	61
Figura 9. Diferentes calidades de blastocistos obtenidos por FIV con semen sexado hembra del toro G	61

CAPÍTULO IV

Figura 10. Blastocistos obtenidos de embriones LZP vitrificados	73
Figura 11. Blastocistos obtenidos de embriones con ZP vitrificados	73

CAPÍTULO V

Figura 12. Diseño experimental para la producción de embriones por TO	83
Figura 13. Hembras receptoras	88
Figura 14. Blastocistos del grupo FIV-LZP teñidos con H33342	94
Figura 15. Blastocistos del grupo FIV-ZP teñidos con H33342	94

CAPÍTULO VI

Figura 16. Diseño experimental para la generación de quimeras transitorias	108
Figura 17. Blastocisto producido en el grupo 2ASF, con expresión de EGFP localizada	121

ABREVIATURAS

‰: Porcentaje

°C: Grados centígrados

µg: Microgramos

µL: Microlitro

µM: Micromolar

µsec: Microsegundos

2n: Diploide

4n: Tetraploide

6-DMAP: 6-Dimetilaminopurina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNmt: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial

AGE: Activación del genoma embrionario

ARN: Ácido ribonucleico

AS: Asincrónico

ATB: Antibiótico

ATP: Adenosín tri-fosfato

BO: Brackett y Oliphant

BSA: Suero albúmina bovina

CM: Células madre

CME: Células madre embrionarias

COCs: Complejos cúmulus oocitos

col.: Colaboradores

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPBS: Solución buffer fosfato Dulbecco

Dr.: Doctor

eCG: Hormona coriónica equina

EE.UU.: Estados Unidos

EG: Etilén glicol

ES: Error estándar

F: Fusionado

FAUBA: Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.

FIV: Fecundación *in vitro*

FSH: Hormona folículo estimulante

g: Fuerza centrífuga

G: Glicerol

gr: Gramo

h: Hora

HMC: Clonación manual

HS: Medio TALP-H suplementado con 20% de SFB

i.m.: Intramuscular

IA: Inseminación artificial

IATF: Inseminación artificial a tiempo fijo

ICSI: Inyección intracitoplasmática del espermatozoide

IFN-Tau: Interferón Tau

Io: Ionomicina

iPSc: Células madre inducidas a la pluripotencialidad

L: Litro

LH: Hormona luteinizante

LOS: Síndrome de la cría grande

LPZ: Libre de zona pelúcida

M: Molar

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

MCI: Macizo celular interno

mg: Miligramos

MI: Metafase I

MII: Metafase II

Min: Minutos

MIV: Maduración *in vitro*

mL: Mililitros

mm: Milímetros

mM: Milimolar

mmHg: Milímetros de mercurio

MPF: Factor promotor de la mitosis

NF: No fusionado

ng: Nanogramos

nm: Nanómetros

Nro.: Número

NY: Nueva York

OPS: Pajuelas abiertas y estiradas

OPU: Aspiración folicular de vacas en pie

pCX-EGFP: Plásmido codificante para la proteína verde fluorescente bajo control del promotor quimérico de citomegalovirus y β -actina de pollo.

PIV: Producción *in vitro*

PVP: Polivinilpirrolidona

S: Sincrónico

Seg: Segundos

SFB: Suero fetal bovino

SOV: Superovulación

SSV: Método de vitrificación en superficie sólida

TALP-H: Tirodes albúmina lactato piruvato con Hepes

TCM-199: Medio de cultivo de tejidos 199

TE: Transferencia de embriones

TN: Transferencia nuclear

TO: Transferencia de ooplastos

TrE: Trofoectodermo

UV: Luz ultravioleta

v/v: Volumen en volumen

V: Volts

WOW: *Well of the Well*, sistema de cultivo en micropozos

ZP: Zona pelúcida

RESUMEN

Título: *Quimeras transitorias en la producción de embriones bovinos*

La transmisión de genética superior y consecuente generación de numerosas crías idénticas de alto valor, permitiría aumentar rápidamente la cantidad y calidad del ganado vacuno. Con este fin, optimizamos la técnica de fecundación *in vitro* (FIV), la cual nos permitió obtener altas tasas de embriones y preñeces. La selección del toro y la realización de experimentos de FIV con semen sexado, consiguieron aumentar los rendimientos por pajuela y la proporción de embriones del sexo deseado en nuestras condiciones. También exploramos un sistema eficiente de criopreservación de embriones libres de zona pelúcida (LZP) por vitrificación, con resultados de sobrevivencia similares al grupo control con ZP. En este sentido, mediante la desagregación de embriones en estadio de 2 y 4 células, y el posterior cultivo LZP, fue posible incrementar la cantidad inicial de embriones. Si bien la TO en presuntos cigotos de FIV permitió generar embriones de mayor tamaño, también afectó severamente tanto la competencia de los embriones como la de sus blastómeras individuales. Sin embargo, la complementación trofoblástica de blastómeras más avanzadas desagregadas demostró ser una alternativa innovadora para la clonación embrionaria. Este procedimiento se realizó electrofusionando embriones producidos por FIV en estadio de 2 células, que luego se agregaron con una única blastómera transgénica, generando lo que llamamos **quimeras transitorias**. Al emplear los embriones aneuploides y más jóvenes fue posible dirigir el destino de cada tipo celular, orientándolos hacia los tejidos extraembrionarios (que se descartarían en el momento del nacimiento), y soportando el desarrollo de una blastómera individual destinada al macizo celular interno (MCI). Por lo tanto, durante el desarrollo de esta Tesis fue posible desarrollar un sistema completo y original de clonación embrionaria, basado en la producción, multiplicación y criopreservación de embriones bovinos LZP.

Palabras clave: *Quimera, Bovino, Fecundación in vitro, Libre de zona pelúcida, Transferencia de ooplastos, Clonación embrionaria, Semen sexado.*

ABSTRACT

Title: *Transient chimeras for bovine embryo production*

Superior genetic transmission and the consequent production of numerous high value identical offspring would allow a rapid increase in the quantity and quality of cattle. With this aim, we optimized the *in vitro* fertilization technique (IVF) that allows us to obtain high embryo and pregnancy rates. Bull selection and the implementation of IVF with sexed sperm resulted in increased yields per straw and in the proportion of embryos of the desired sex in our conditions. In this Thesis, zona-free (ZF) embryo cryopreservation system by vitrification was also evaluated, with survival rates similar to the ZP control group. In this regard, 2- and 4-cell embryo disaggregation followed by ZF culture was useful to replicate the initial number of embryos. Although ooplast transfer (OT) in IVF presumptive zygotes allowed production of bigger embryos, it severely affected embryos and individual blastomeres developmental potential. In opposition, trophoblastic complementation with disaggregated blastomeres, more advanced in development, was an innovative alternative for embryo cloning. We did this procedure by electrofusion of IVF embryos at the 2-cell stage that were aggregated with a unique transgenic blastomere, generating transient chimeras. Employing aneuploid and younger embryos, it was possible to direct the fate of each cell type, guiding them towards extraembryonic tissues (which will be discarded at the time of birth), and supporting the development of a single blastomere destined to the inner cell mass (ICM). Therefore, during this Thesis it was possible to develop a complete and original method of embryo cloning, based on the production, multiplication and cryopreservation of ZF bovine embryos.

Keywords: *Chimera, Bovine, In vitro fertilization, Zona-free, Ooplast transfer, Embryo Cloning, Sexed semen.*

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LA HEMBRA BOVINA

El estudio y comprensión de la fisiología reproductiva resulta de fundamental importancia tanto para la investigación básica como la aplicada, especialmente en lo referente a las prácticas de biotecnologías reproductivas. A continuación se describirán las bases más relevantes de la fisiología reproductiva de la hembra bovina, desde la generación de las gametas femeninas y la formación y desarrollo de los embriones producidos naturalmente, hasta las técnicas reproductivas biotecnológicas relevantes en el desarrollo de esta Tesis.

1.1.1. *Desarrollo folicular y maduración ovocitaria*

En la vida fetal, durante el desarrollo de los ovarios de las hembras de mamífero, las células germinales u ovogonias se dividen por mitosis y son rodeadas de una monocapa de células somáticas epiteliales que se convertirán luego en células pre-granulosa (Sawyer y col., 2002). En ese momento, las ovogonias se diferencian en oocitos, los cuales son capaces de iniciar su actividad meiótica. En este punto, las gametas femeninas interrumpen el proceso de meiosis en el estadio diplotene de la profase de la primera división (meiosis I o MI) hasta la pubertad (Cunninham, 2005). Los oocitos se encuentran en estructuras llamadas folículos primordiales, que se irán desarrollando para formar los folículos primarios (donde el oocito comienza su fase de crecimiento) y luego los secundarios (cuando las células foliculares forman una doble capa) (Eppig, 2001). El pool de folículos primordiales es la mayor población existente (Figura 1). La presencia de factores inhibitorios, como el estradiol (Yang y Fortune, 2008) o la hormona antimulleriana (Fortune, 2003) son de suma importancia para mantener el grupo de folículos primordiales. Este proceso es independiente de la concentración de gonadotrofinas. En el feto bovino, los folículos primordiales, primarios y secundarios o preantrales se forman por primera vez alrededor de los días 90, 140 y 210 de gestación, respectivamente (Yang y Fortune, 2008). El crecimiento folicular se inicia antes de que el último folículo primordial se haya formado y continúa durante la vida fetal, neonatal y adulta (Scaramuzzi y col., 2011). Durante el

desarrollo del folículo primario se produce un incremento de volumen del oocito, con un aumento de la cantidad de organelas, y aparece la zona pelúcida (ZP) rodeándolo (Lundy y col., 1999). La ZP es una matriz extracelular porosa de glicoproteínas que rodea al oocito, interviene en la fecundación y protege el desarrollo del embrión durante las primeras etapas del desarrollo (Hoodbhoy y Dean, 2004; Papi y col., 2102). Sin embargo, en este momento el oocito aún es incompetente para progresar a través de la meiosis y, consecuentemente, incapaz de continuar con su desarrollo. Durante la formación de los folículos preantrales aumenta el número de capas de las células de la granulosa que comienzan a diferenciarse y presentar receptores para la hormona leutenizante (LH) (Lundy y col., 1999). La siguiente etapa, dependiente de gonadotrofinas, conduce a la formación de un folículo antral o terciario. Una vez que el antro está bien desarrollado pasa a denominarse folículo de De Graaf (Eppig, 2001). En ese momento ya se diferencian dos tipos celulares a partir de las células de la granulosa: células que rodean al oocito (células del cúmulus) y células que rodean la cavidad antral (células de la granulosa mural). Asimismo, aumenta la tasa de atresia folicular (Scaramuzzi y col., 2011). Finalmente, las hormonas folículo estimulante (FSH) y LH conducirán la diferenciación de las células murales en células de la teca, que formarán parte del cuerpo lúteo luego de la ovulación (McNatty y col., 2007). Este proceso es inhibido en las células del cúmulus por factores secretados por el oocito (Eppig y col., 1997).

Con el desarrollo de los folículos antrales, los oocitos adquieren competencia meiótica y pueden progresar hasta el estadio de metafase de la segunda división meiótica (metafase II o MII). La adquisición de la competencia para el desarrollo depende, en parte, de eventos conocidos como maduración citoplasmática. Este proceso implica cambios morfológicos (reducción del aparato de Golgi, aumento del contenido lipídico, localización de los gránulos corticales y aumento del espacio perivitelino) (Aparicio y col., 2011) y bioquímicos (poliadenilación, traducción y la degradación de ARN mensajeros) (Rodríguez y Farin, 2004), que le permitirán ser fecundado y sostener el desarrollo embrionario (Hyttel y col., 1997; Rodríguez y Farin, 2004). En bovinos, dichas capacidades son dependientes del diámetro del folículo y del tamaño del oocito. Cuando el folículo alcanza 2 mm de

diámetro y los oocitos pasan de 110 a 120 μm de diámetro adquieren la competencia ovocitaria (Sirard y col., 2006).

Por acción de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) secretada por el hipotálamo, la hipófisis produce dos tipos de gonadotrofinas: LH y FSH. Las concentraciones de FSH, que estimulan la producción de estrógenos por parte del folículo antral, inducen la formación de receptores de LH en las células de la granulosa. La concentración creciente de estrógenos resulta en el inicio del pico preovulatorio de gonadotrofinas. En bovinos, la ovulación ocurre aproximadamente unas doce horas después del celo en respuesta a un pico de LH que induce la expresión de numerosos factores intrafoliculares y la activación de distintas cascadas de señalización. De esta manera, el oocito maduro (en estadio de MII) es liberado al oviducto y comienza la expresión de progesterona por parte de las células ahora ya luteales (Cunninham, 2005). En la Figura 1 se resume y esquematiza un modelo de foliculogénesis modificado recientemente de Scaramuzzi y col., (1993) (Scaramuzzi y col., 2011).

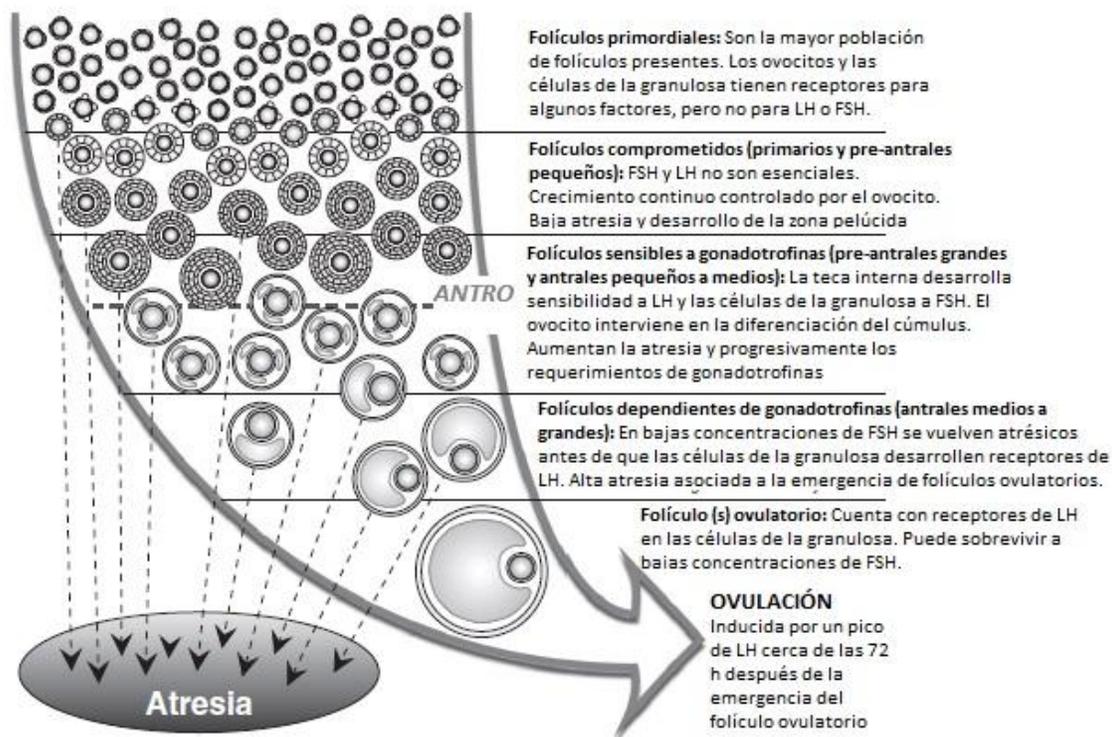


Figura 1. Foliculogénesis. Un modelo para la foliculogénesis en oveja basado en aquel desarrollado por Scaramuzzi y col. (1993). La foliculogénesis es ilustrada como una cascada de desarrollo durante la cual los folículos emergen a partir de un pool de folículos primordiales para entrar en un proceso de crecimiento que es continuo y acaba en atresia o en ovulación. En la mayoría de los mamíferos este proceso es aproximadamente lineal con el estadio sensible a gonadotrofinas y, especialmente en rumiantes, se transforma en una onda folicular en el estadio dependiente de gonadotrofinas. (Modificado de Scaramuzzi y col., 2011).

1.1.2. Fecundación y desarrollo embrionario

El oocito es fecundado por el espermatozoide en la ampolla del oviducto. La detención del proceso de meiosis del oocito en el estadio MII se debe principalmente a niveles altos del factor promotor de la meiosis (MPF) activo (Picton y col., 1998; Williams, 2002) y niveles bajos de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), encargada de mantener el estado de condensación cromosomal durante la transición de MI a MII y de prevenir la formación de la envoltura nuclear (Murray y Hunt, 1993). La fusión del oocito con el espermatozoide desencadena una serie de oscilaciones de Ca^{+2} intracelular (Fissore y col., 1992), que conducen a la activación del oocito y, a través de una serie de cascadas de eventos, la disminución de los niveles de MPF activo. Consecuentemente el oocito finaliza el proceso meiótico (observado por la extrusión del segundo corpúsculo polar) y se forma el pronúcleo femenino. Asimismo, las oscilaciones de Ca^{+2} , inducidas por el ingreso del espermatozoide, permiten que se produzca la exocitosis de los gránulos corticales, ubicados en las cercanías de la membrana plasmática del oocito. Su función consiste en modificar la composición de la ZP y evitar así la poliespermia (Williams y col., 2002). Este fenómeno puede ser imitado en condiciones *in vitro* mediante un proceso denominado activación partenogénica. Para ello se emplean agentes químicos como el estroncio, el etanol o los ionóforos de calcio (ionomicina, Io), que generan el estímulo de aumentar los niveles de Ca^{+2} intracelular (Alberio y col., 2001; Bevacqua y col., 2010). La Io produce la liberación de un único pico de Ca^{+2} que puede causar la inactivación temporaria de MPF. Por lo tanto, es necesario combinar su uso con otros compuestos inhibidores de la síntesis de proteínas (aquellas que regulan la actividad de MPF), como la cicloheximida, o lo que resulta aún más específico, 6-dimetilaminopurina o 6-DMAP (Szöllösi y col., 1993). La función del 6-DMAP aún está en controversia. Algunos autores sugieren, entre otras funciones, la activación de MAPK (Alberio y col., 2001); mientras que otros le adjudican un efecto inhibitorio sobre MPF (Liu y Yang, 1999).

Posteriormente, la unión de las dos gametas haploides produce la singamia de los pronúcleos masculino y femenino. A partir de entonces, el cigoto, como una única célula totipotente, comienza a experimentar su primera mitosis o clivaje (Comizzoli y col., 2000). Las células del embrión durante las primeras divisiones reciben el nombre de blastómeras,

que solo comienzan a formar uniones estrechas entre sí después de varios ciclos celulares (Ozawa y col., 2012). El embrión continúa sus divisiones sin un aumento de tamaño y se dirige hacia el útero (Knobil y Neil, 1994). La activación del genoma embrionario (AGE) bovino ocurre en el estadio de 8 a 16 células (Crosby y col., 1988; Frei y col., 1989; Memili y First, 1999). En ese momento, el embrión deja de depender exclusivamente de factores maternos contenidos en el oocito y comienza a sintetizar sus propios componentes.

El embrión llega al útero en el estadio de mórula (Spencer y col., 2008). La mórula se compacta y continúa su desarrollo hasta blastocisto, estadio en el cual el embrión desarrolla una cavidad llena de líquido, llamada blastocele. En el estadio de blastocisto se definen por primera vez dos poblaciones celulares con características morfológicas y funcionales bien marcadas: el macizo celular interno (MCI) y el trofoectodermo (TrE). El MCI luego se diferenciará en hipoblasto y epiblasto. El hipoblasto formará el endodermo extraembrionario y el saco embrionario; mientras que el epiblasto dará origen al embrión propiamente dicho (formado por el ectodermo embrionario y al disco germinal, para posteriormente diferenciarse en el endodermo embrionario y el mesodermo) (Gilbert, 2000). Por otro lado, el TrE consiste en una única capa de células que rodea externamente al blastocisto y formará solo el ectodermo extraembrionario. El TrE cumple una función nutricia muy importante (Wintenberger-Torres y Flechon, 1974) y un rol fundamental en el establecimiento de la preñez, a través de la secreción de interferón tau (IFN-Tau) (Bazer y col., 2008). Asimismo, tiene funciones antiluteolítica, antiviral, antiproliferativa e inmunomoduladora (Demmers y col., 2001). En el útero, el blastocisto sufre los eventos de eclosión (cuando se libera de la ZP), precontacto, orientación, aposición, adhesión al útero y penetración del endometrio. Las células del TrE se especializan, reciben el nombre de células trofoblásticas y se dividen en dos poblaciones: las células mono y binucleadas (Wimsatt, 1951; Greenstein y col., 1958). Las células mononucleadas son las principales encargadas del intercambio de nutrientes; mientras que las células trofoblásticas binucleadas secretan hormonas (como lactógeno y progesterona) y, junto con las células endometriales forman la placenta epiteliocorial (Duello y col., 1986). La placenta será el único canal de transporte de nutrientes hacia el concepto. Durante esta expansión, el blastocisto adquiere morfologías diferenciales (esférica, ovoide, tubular y filamentosa),

alcanzando 150 mm de diámetro en el día 17, cuando se produce el reconocimiento de la preñez (Figura 2) (Degrelle y col., 2005). En el bovino, la implantación ocurre alrededor del día 21 del desarrollo, cuando aumenta el tamaño del TrE y el embrión sufre otra etapa de elongación hasta alcanzar 300 mm de diámetro (Degrelle y col., 2005; Rodríguez-Álvarez y col., 2009). En ese momento comienza una etapa de activa proliferación de las células placentarias (cotiledones) y del endometrio materno (carúnculas), que se convertirán en placentomas y establecerán la comunicación materno-fetal (Sugawara y col., 2010). Luego se establecen las membranas extraembrionarias amnios y saco embrionario (Ledgard y col., 2006) y comienza el proceso conocido como gastrulación (Guillomot y col., 2004). *In vitro*, los embriones no presentan la capacidad de elongación, lo cual evidencia que un diálogo coordinado entre el endometrio y el concepto resulta fundamental para este proceso (Blomberg y col., 2008). El período embrionario se extiende hasta el día 42 en bovinos, cuando comienza el período fetal (Bech-Sàbat y col., 2010). La duración de la preñez es de nueve meses.

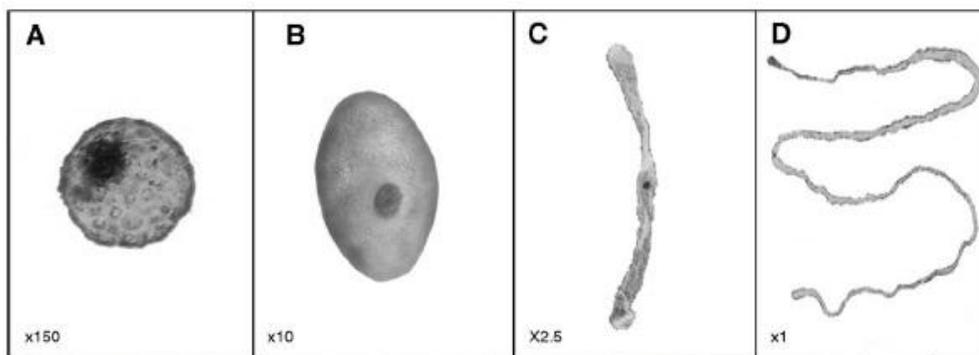


Figura 2. Crecimiento y diferenciación de blastocistos bovinos preimplantatorios. (A) Esférico. (B) Ovoide. (C) Tubular. (D) Filamentoso temprano. (Modificado de Degrelle y col., 2005).

1.2. BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS

El conocimiento de la fisiología del desarrollo ha permitido comenzar a manipular el sistema reproductor de la hembra. La biotecnología de la reproducción comprende técnicas que permiten aumentar y mejorar la eficiencia reproductiva de los animales. En las últimas décadas, la reproducción del ganado bovino ha evolucionado de manera acelerada y este incremento se debe fundamentalmente a la necesidad de aumentar la producción de leche y carne, conforme a las necesidades de consumo de la población en constante crecimiento. En este sentido, las biotecnologías reproductivas aplicadas a estos sectores han permitido contribuir tanto al incremento rápido del número de animales como a su mejoramiento genético. La producción de embriones mediante estas técnicas pueden dividirse en dos grupos principales: la producción de embriones *in vivo* e *in vitro*.

La superovulación (SOV) de hembras de alto valor genético combinada con la inseminación artificial (IA) y la transferencia de embriones (TE) a hembras receptoras de bajo mérito genético se han convertido en el principal sistema de producción de embriones bovinos *in vivo* en Argentina. Por otro lado, la generación de embriones mediante fecundación *in vitro* (FIV) de oocitos recuperados por aspiración folicular (OPU, del inglés *ovum pick-up*) de ovarios de vacas de interés comercial, combinado también con la TE, está creciendo considerablemente en el país. Dentro del grupo *in vitro*, donde los embriones son generados en condiciones de laboratorio, también es posible enumerar técnicas más sofisticadas como la clonación o transferencia nuclear (TN) y la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI, del inglés *intracytoplasmic sperm injection*). La TN permite la generación de copias idénticas de un individuo que, junto con la transgénesis animal, tienen numerosas aplicaciones en las áreas de producción animal, industria farmacéutica y biomedicina. La ICSI, en cambio, actualmente se encuentra más restringida a la producción de embriones humanos en clínicas de fecundación asistida.

Como biotecnologías reproductivas también es posible incluir técnicas casi olvidadas, como la producción de gemelos idénticos mediante la división de embriones (ya sea de manera quirúrgica o por desagregación de blastómeras) y la producción de quimeras. Uno de los objetivos fundamentales de esta Tesis fue estudiar el efecto de nuevas

modificaciones en estas técnicas desarrolladas hace casi tres décadas y prácticamente no aplicadas en la actualidad, para tornarlas más eficientes.

Asimismo, la criopreservación de embriones ha jugado un papel fundamental en la implementación de las biotecnologías reproductivas. Los avances en las diferentes técnicas de criopreservación de los embriones producidos han permitido disponer mejor de las hembras donantes, independizándose de los tiempos biológicos y de los resultados de los protocolos de sincronización, como también han posibilitado transportar y comercializar genética de forma económica entre países de distintos continentes.

A continuación se brindará un marco teórico de todas las biotecnologías reproductivas empleadas para el desarrollo de esta Tesis.

1.2.1. *Producción de embriones in vivo*

1.2.1.a. *Superovulación*

La SOV es una tecnología que permite manipular la onda folicular de los animales (Bó y col., 1995; 2002; 2006; Baruselli y col., 2006), permitiendo la ovulación de múltiples folículos en aquellas especies mono o biovulatorias, como el bovino, el ovino y el equino. Mediante la administración de hormonas es posible evitar la atresia folicular de aquellos folículos subordinados, permitiendo la superovulación (Bó y col., 1995). Una de las hormonas más utilizadas para este objetivo es la FSH (Bó y col., 2006; Baruselli y col., 2006). También se emplean otras con el mismo efecto, como la gonadotrofina coriónica equina (eCG) o FSH recombinantes (Sá Filho y col., 2010). De esta manera, el efecto más importante es la estimulación del crecimiento del folículo dominante y, con eso, el aumento en la tasa de ovulación (Sá Filho y col., 2010). Además de la estimulación del crecimiento folicular, resulta importante sincronizar las ovulaciones mediante el empleo de hormonas con efecto LH. Sin embargo, la respuesta superovulatoria resulta muy variable debido a tres factores principales: el protocolo empleado, la hembra estimulada y su medio ambiente (Palma GA, 2001). Entre otros factores intervinientes en estos tratamientos, resulta esencial el control de la condición nutricional de la hembra donante. Durante el amamantamiento, el balance energético de la donante es negativo, ya que gran parte de su energía es destinada a la producción de leche (Williams y col., 2002). En el mismo sentido, para obtener resultados

óptimos es necesario garantizar una oferta de alimentos sin restricciones para que las hembras equilibren el balance energético durante el período de monta (Bó y col., 2007).

1.2.1.b. Inseminación artificial

La IA es una de las técnicas reproductivas de mayor aplicación, junto con la congelación de semen. Ha permitido disminuir las enfermedades infecciosas transmitidas a través de la cópula y obtener mayor descendencia de un macho, aprovechando el uso de reproductores. Durante la monta natural, el toro deposita billones de espermatozoides en la vagina de la hembra. Sin embargo, el cérvix resulta un obstáculo, por lo que normalmente solo 1% de los espermatozoides eyaculados consigue llegar al cuerpo uterino. En la IA, normalmente el semen es depositado directamente en el útero, disminuyendo la cantidad de espermatozoides necesarios (López-Gatius, 2000). En el caso de empleo de semen sexado se recomienda una inseminación más profunda, dado su menor calidad comparada con el semen convencional (Buchanan y col., 2000).

Los protocolos actuales de IA buscan liberarse de la necesidad de detectar celo para realizar la práctica a través de la implementación de tratamientos de sincronización. En este sentido, la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) también permite trabajar con un mayor número de hembras (Fernandes y col., 2001; Caraviello y col., 2006; Galvão y col., 2007) y facilita la ejecución de la superovulación (Bó y col., 2006).

1.2.1.c. Transferencia de embriones

La TE es otra biotecnología en constante desarrollo y se la asocia con protocolos de SOV e IA de hembras donantes con genética de calidad. Sin embargo, en los últimos años también ha tenido alto impacto debido a la creciente producción de embriones *in vitro* (PIV). La TE es una estrategia que aumenta considerablemente el número de descendencia materna, aumentando el progreso genético (Smith, 1988). Asimismo, la congelación y almacenamiento de embriones han permitido manejar más libremente el uso de receptoras en un programa de TE, como también transportar y comercializar internacionalmente material genético con la seguridad de que los embriones se encuentran libres de patógenos (Mapletoft y Hasler, 2005).

1.2.2. Producción de embriones *in vitro*

1.2.2.a. Aspiración folicular

La técnica de OPU surgió a partir de una adaptación de un método de aspiración folicular en humanos (Pieterse y col., 1988). A partir de entonces fue posible su implementación en programas de vacas vivas (Kriup y col., 1991). La OPU, combinada con la PIV, está aumentando y mejorando la producción de embriones a partir de donantes seleccionadas en vida (García y Salahedinne, 1998). Asimismo, la OPU permite disminuir el intervalo generacional a partir de la aspiración tanto de ovarios de terneras o vaquillonas prepúberes (Duby y col., 1996; Fry y col., 1998; Salamone y col., 2001; Palma GA, 2001), como también de vacas preñadas (Argov y col., 2004; Aller y col., 2012).

Tal como se describió anteriormente, el ovario es un órgano dinámico. Entre individuos existe una gran variabilidad respecto de los folículos antrales y preantrales, y de la cantidad de oocitos en los ovarios. En este sentido, la raza o la subespecie pueden ejercer una gran influencia. Por ejemplo, las razas europeas (*Bos taurus*) tienen un número menor de folículos antrales y oocitos en comparación con razas índicas (*Bos indicus*) (Burns y col., 2005; Ireland y col., 2007; Pontes y col., 2009; 2011). Este hecho puede ser el motivo principal por el cual Brasil, con su amplia diseminación de ganado índico, ha logrado desarrollar exitosamente procedimientos de OPU combinados con FIV a gran escala (Stroud, 2012; Viana, 2012). Sin embargo, existe repetitividad entre individuos, independientemente de la edad, la raza, el estadio de lactación o la estación de monta (Burns y col., 2005). Incluso ha sido determinado que el pool de folículos pre-antrales en un ovario tiene alta correlación con los folículos antrales y con la fertilidad (Mossa y col., 2012). Se presume también cierto grado de heredabilidad hacia las hijas. El empleo de ultrasonografía (King, 2006) y análisis genómicos (Meuwissen y col., 2011; Schaeffer, 2006) para la selección de hembras con mayor cantidad de oocitos está permitiendo identificar los animales con mejores características reproductivas.

1.2.2.b. Fecundación *in vitro*

La fecundación es un proceso complejo que implica la penetración de un espermatozoide capacitado en un oocito maduro, restableciendo la carga cromosómica somática e iniciando el desarrollo embrionario. La FIV consiste en realizar este proceso fuera del tracto genital femenino, controlando simultáneamente que la maduración ovocitaria y el posterior cultivo *in vitro* se lleven a cabo de una manera correcta. La FIV es la técnica de reproducción asistida que más se asemeja a la concepción natural. Fue desarrollada en los años 60 en animales de laboratorio y se empleó con éxito por primera vez en 1978 en seres humanos. En bovinos, la primera FIV exitosa fue realizada por Brackett y col. (1982), utilizando oocitos madurados *in vivo* y recuperados quirúrgicamente (Brackett y col., 1982).

Antes de adquirir su capacidad fecundante, los espermatozoides deben sufrir una preparación que normalmente ocurre en el tracto genital femenino (Parrish y col., 1986; 1988; Rodríguez-Martínez, 2007a). Principalmente, se trata de cambios que involucran la capacitación del espermatozoide y la reacción acrosómica. De esta forma, ocurre una alteración inicial de la membrana plasmática espermática que permite que se desarrolle la segunda fase, donde se fusionan la membrana plasmática del espermatozoide y la membrana acrosomal externa (Sánchez y col., 2011). Actualmente, a pesar de contar con un alto desarrollo en los medios de cultivo y los protocolos de trabajo, los resultados de FIV continúan siendo variables cuando se usan diferentes toros (Zhang y col., 2003). Existen diferencias en la motilidad, capacitación y reacciones acrosómicas de los espermatozoides, que terminan en un efecto macho que afectan las tasas de fertilización y, con ello, el desarrollo de embriones *in vitro* (Aoyagi y col., 1988).

La PIV ha permitido cultivar embriones hasta estadios transferibles, evitando la TE quirúrgica y disminuyendo los costos. Particularmente, combinada con la obtención de oocitos de vacas en pie (por OPU) permite acelerar el proceso reproductivo, ya que una vaca puede ser satisfactoriamente empleada como donante cada semana (García y Salaheddine, 1998; Taneja y col., 2000); también permite utilizar donantes de alto valor genético que no responden a tratamientos de SOV o incluso con problemas de fertilidad.

Asimismo, permite la obtención de un alto número de embriones y reduce el número de espermatozoides viables necesarios para fecundar en comparación con la IA o el servicio natural. A su vez, las gametas pueden estar conservadas bajo técnicas de criopreservación y es posible controlar y decidir su aplicación (Mapletoft y Hasler, 2005). Por otro lado, el uso de espermatozoides con el sexo deseado (empleo de semen sexado) ha permitido seleccionar el sexo de las crías de acuerdo a los objetivos establecidos (Johnson y col., 1987; Lu y Seidel, 2004; Xu y col., 2006; Johnson, 2000); evitando la complejidad de las biopsias de embriones preimplantatorios seguidas de análisis moleculares para la detección del sexo de las blastómeras extraídas (Macháty y col., 1993) y las pérdidas de fetos del sexo no deseado, detectado por ecografía.

La FIV con semen sexado aumenta los rendimientos por pajuela sexada y posibilita, por ejemplo, aumentar la producción de terneras en un rodeo lechero. En un procedimiento típico de FIV con semen sexado (Figura 3), los oocitos son colectados de ovarios de matadero con o sin información de pedigree (Aller y col., 2000, Wilson y col., 2005; Xu y col., 2006), o de animales vivos a través de aspiración folicular. Por el lado masculino, espermatozoides de toros de elite se separan y clasifican por citometría de flujo y clasificación de células (más conocida en inglés como *cell sorting*), en el proceso de sexado de semen (Johnson y col, 1987; Johnson, 2000). Los espermatozoides portadores del cromosoma sexual X (especialmente para rodeos lecheros, donde se prefieren las hembras) son usados para fecundar oocitos maduros. Los embriones derivados de este procedimiento son cultivados *in vitro* hasta el estadio de blastocisto (día 7), después de lo cual se transfieren frescos a hembras receptoras debidamente sincronizadas o se criopreservan (Xu y col., 2009).

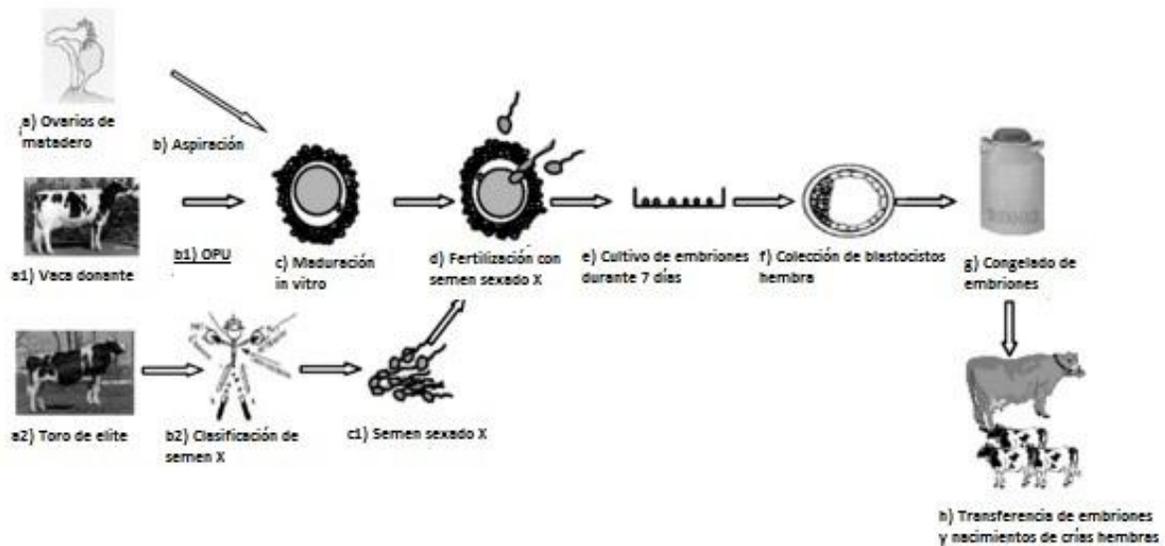


Figura 3. Esquema del procedimiento de FIV con semen sexado. (a) Ovarios de matadero con o sin información de pedigree. (b) Los oocitos son extraídos por punción folicular, (c) se seleccionan y se someten a maduración *in vitro*. Como una alternativa, (a1) pueden emplearse vacas con información de pedigree completa, con o sin un tratamiento de estimulación hormonal previo a la punción. (b1) Los oocitos son colectados por OPU. (a2) Un toro de elite se selecciona para separar y clasificar sus espermatozoides, según contengan el cromosoma X o Y. (b2) El semen colectado es clasificado por citometría de flujo. (c1) Los espermatozoides X se usan para FIV en rodeos lecheros. (d) Los oocitos maduros son fertilizados con semen sexado hembra (X). (e) Los embriones son cultivados *in vitro* durante 7 días y, posteriormente (f) son evaluados morfológicamente. (g) Los blastocistos obtenidos pueden ser criopreservados o bien (h) transferidos a vacas receptoras previamente sincronizadas para obtener crías del sexo femenino. (Modificado de Xu y col., 2009).

1.2.2.c. Clonación y transgénesis

La clonación y la transgénesis con fines medicinales permiten utilizar animales como fuentes de producción de proteínas farmacológicas relevantes para la salud humana (Cibelli y col., 1998; Salamone y col., 2006).

La clonación es un proceso mediante el cual se logra un organismo con la misma información genética que un individuo existente. Se trata de un tipo de reproducción asexual, cuya principal aplicación es obtener una copia de un animal de gran valor, ya sea en el ámbito económico (como en equinos y bovinos) como sentimental (mascotas). El primer mamífero clonado por la técnica de TN, a partir de una célula somática adulta y especializada de la glándula mamaria, fue la reconocida oveja Dolly (Wilmut y col., 1997). Desde entonces numerosas publicaciones han reportado resultados de clonación en diferentes especies. Cumulina fue el primer clon de ratón obtenido de células del cúmulus de oocitos (Wakayama y col., 2008). En Argentina, en 2002, nació Pampa, el primer clon vacuno de la raza Jersey generado por el Dr. Daniel Salamone (Salamone y col., 2006). Un año más tarde fue reportado el nacimiento de la yegua Prometea, el primer clon equino generado a partir de células de su propia madre (Galli y col., 2003). Con el transcurso del tiempo, la técnica de clonación fue mejorando, aunque no a la velocidad que se especuló, resultando en un procedimiento más ineficiente de lo que se esperaba. Aún así las investigaciones continúan centradas en aumentar el rendimiento y disminuir tanto las altas tasas de mortalidad como las anomalías congénitas que afectaron a muchos de los animales previamente mencionados. En bovinos se han descrito problemas asociados a la clonación, agrupados como el “síndrome de la cría grande” (LOS, del inglés *large offspring syndrome*) (Smith y col., 2012; Liu y col., 2013).

Otra aplicación interesante de la TN es la recuperación de individuos de especies amenazadas. En 2009 se logró el nacimiento, aunque poco satisfactorio, del primer clon de un animal extinto: el bucardo (Folch y col., 2009). Actualmente, centros de investigación se están centrando en la clonación terapéutica, que tendría múltiples aplicaciones en humanos. El estudio de los sistemas relacionados con el desarrollo embrionario *in vitro* permitirá superar las limitaciones de las biotecnologías actuales.

Por otro lado, la transgénesis es una herramienta de ingeniería genética que permite insertar una molécula de material genético exógeno (ADN) en un organismo que normalmente no la posee. El primer nacimiento de un mamífero transgénico correspondió a un ratón generado por microinyección pronuclear (en estadio unicelular) (Gordon y col., 1980). Desde entonces varios sistemas de producción de transgénicos han sido desarrollados: TN (Cibelli y col., 1998; Salamone y col., 2006); inyección citoplasmática con vectores espermáticos (Perry y col., 1999), retrovirales y lentivirales (Haskell y Bowen, 1995); inyección de células madre embrionarias (CME) (Shiue y col., 2006); y microinyección de vesículas (Pereyra-Bonnet y col., 2011; Bevacqua y col., 2012). Sin embargo, la producción de especies domésticas genéticamente modificadas continúa siendo altamente ineficiente debido al mosaicismo (excepto en la técnica de TN o inyección de CME) producido cuando solo algunas de las células del embrión incorporan el transgén (Perry y col., 1999), o bien lo hacen con diferente número de copias (Bevacqua y col., 2013).

1.2.5. Multiplicación de embriones

Los embriones tempranos de mamífero tienen un amplio potencial de desarrollo. En los años 80, la bisección de embriones permitió generar gemelos a partir de un único embrión. En Argentina, los primeros mellizos homocigotas producidos por división microquirúrgica fueron obtenidos por el equipo de Palma y correspondieron a terneros de la raza Aberdeen Angus (Palma y col., 1991). En estos procedimientos, embriones post-compactación son cortados con una cuchilla microquirúrgica de metal (Williams y col., 1984) o con una fina aguja de vidrio (Willadsen y Godke, 1984). Sin embargo, las desventajas radican en las pérdidas celulares ocasionadas por el daño físico de los instrumentos, que genera demi-embryones con menos de la mitad de las células del embrión original. De esta manera, se producen blastocistos con bajo número de células, que disminuyen los porcentajes de preñez luego de ser transferidos. El uso de animales gemelos en experimentación animal puede reducir sustancialmente los números requeridos para generar información estadísticamente válida (Biggers, 1986).

Por otra parte, particularmente en bovinos, fue posible comprobar que hasta la mitad de las células de embriones de 2 a 16 células pueden ser removidas, sin perder la capacidad de desarrollo del embrión original (Loskutoff y col., 1993). La posibilidad de disminuir la cantidad de blastómeras de un embrión es el fundamento de procedimientos tan ampliamente empleados en la actualidad, como las biopsias y el sexado de embriones (Macháty y col., 1993). En el mismo sentido, incluso blastómeras individuales de embriones murinos de 8 células han permitido generar líneas de células madre (CM) (Chung y col., 2006; Wakayama y col., 2007), indicando persistencia de la pluripotencialidad, a pesar de haber activado previamente su genoma embrionario.

Asimismo, la generación de 2 y 4 crías idénticas bovinas (Willadsen y Polge, 1981; Johnson y col., 1995; Tagawa y col., 2008), ovinas (Willadsen y col., 1981) y de conejos (Moore y col., 1968) a partir de embriones de 2, 4 y 8 células, demuestra claramente la totipotencialidad de dichas células. En general, los mecanismos empleados se basan en la separación de las células del embrión temprano mediante micromanipulación y su posterior introducción en ZP vacías, implicando la transferencia transitoria en oviductos para permitir el desarrollo embrionario (Willadsen y Polge, 1981; Johnson y col., 1995). Sin embargo, Vajta y col. (2000) generaron el sistema de cultivo de micropozos en placa denominado WOW (del inglés, *Well of the Well*) (Vajta y col., 2000). De esta manera, es posible realizar el cultivo de embriones libres de zona pelúcida (LZP), concentrando factores autócrinos y parácrinos en las depresiones, como ocurre en las gotas convencionales de cultivo. De la misma manera, las microdepresiones evitan la separación natural de los embriones causada por la ausencia de uniones intercelulares durante las primeras divisiones mitóticas. Recientemente, Tagawa y col. (2008) combinaron el sistema de cultivo WOW con la desagregación de blastómeras mediante pipeteo, obteniendo resultados más alentadores que, por ejemplo, la bisección con microcuchilla (Tagawa y col., 2008).

Sin embargo, el estadio en el cual comienza la expresión genómica del embrión podría representar una limitante en la multiplicación de embriones. Este es el momento en el cual el embrión activa su genoma y comienza a controlar su desarrollo, luego de una fase

de transición materno-embionaria, en la cual el embrión deja de depender de los transcritos maternos (acumulados en el oocito) para empezar a generar los propios (Palma GA, 2001). Varios autores afirman que, en el bovino, la AGE ocurre en la mitad del estadio de 8 células (Crosby y col., 1988; Frei y col., 1989; Memili y First, 1999).

1.2.6. Quimeras

En la mitología griega, la quimera es una bestia con la cabeza de un león, el cuerpo de una cabra y la cola de un dragón (Homero, La Ilíada) (Figura 4). Actualmente, en biología, el término quimera se aplica a la mezcla de células derivadas de más de un animal (Rossant y col., 1982).



Figura 4. Quimera de la mitología griega. En la mitología griega, la quimera es una bestia con la cabeza de un león, el cuerpo de una cabra y la cola de un dragón.

Los embriones quiméricos tienen diversas aplicaciones. En el campo de la ciencia son herramientas interesantes para el estudio del desarrollo temprano y la diferenciación en mamíferos (McLaren, 1975) y la introducción de CM transgénicas en blastocistos (Gossler y col., 1986; Robertson y col., 1986). Las quimeras interespecíficas también ofrecen la posibilidad de estudiar incompatibilidades reproductivas entre especies y neutralizarlas (Fehilly y col., 1984a).

Existen dos técnicas básicas para la producción de embriones quiméricos: la inyección de blastocistos y la agregación de embriones. En 1983, Summers realizó ambos procedimientos entre las razas Friesian y Angus (*Bos taurus*) con Brahman (*Bos indicus*). En aquel momento la inyección de MCI en la cavidad de blastocistos representó la mejor opción; pero fue sugerido que las condiciones de cultivo de los embriones agregados LZP eran inapropiadas (Summers y col., 1983). Las agregaciones se han realizado en tubos con medio de cultivo (Summers y col., 1983), en ZP de oocitos (Fehilly y col., 1984b) o de embriones microquirúrgicamente vaciadas (Piccard y col., 1990; Boediono y col., 1999) o con embriones LZP (Wood y col., 1993a; 1993b; Vajta y col., 2000). Adicionalmente, Wood y col. (1993) realizaron quimeras mediante el cocultivo de una capa de CM con varios embriones en estadio de 8 células en la especie murina. Fue posible obtener nacimientos a través de este simple procedimiento, permitieron determinar quimerismo incluso en la línea germinal (Wood y col., 1993a).

Hasta el advenimiento de las tecnologías del ADN recombinante, el quimerismo intraespecífico se vio limitado dada la baja disponibilidad de marcadores especie-específicos. En bovinos, Picard y col. (1999) emplearon un marcador cromosómico de un toro suizo rojo y blanco que cuenta con una traslocación heterocigota 1/29 en los cromosomas sexuales para inseminar hembras Holando y Hereford. En su trabajo, embriones generados de esta manera fueron agregados con embriones fertilizados con semen de toro normal. Luego, el análisis cromosómico de linfocitos permitió determinar el tipo de quimerismo (Picard y col., 1990). Por su parte, el quimerismo interespecífico admite determinar las localizaciones celulares por la evaluación de los genomas de cada especie (Rossant y col., 1982; Ruffing y col., 1993). Fehilly y col. (1985) realizaron

análisis citogenéticos de linfocitos de sangre umbilical y de las quimeras obtenidas para identificar el quimerismo de las crías (Fehilly y col., 1985).

Para el caso de las quimeras entre CM y embriones, Wood y col. (1993) concluyen en que no existen diferencias significativas entre los procedimientos de inyección y agregación, pero resalta la simplicidad de esta última, requiriendo únicamente de una pipeta Pasteur y un entrenamiento básico en la manipulación de embriones (Wood y col., 1993b).

1.2.4.a. Complementación trofoblástica

La complementación trofoblástica es una estrategia que surge a la necesidad de aumentar la actividad funcional de las agregaciones embrionarias. Los embriones poliploides (particularmente tetraploides o $4n$) han sido ampliamente utilizados en este sentido, para compensar la letalidad embrionaria, como resultado de fenotipos cuyos tejidos extraembrionarios son defectivos o bien para la generación de embriones derivados de CM (Nagy y col., 1990).

En agregados diploides/tetraploides ($2n/4n$), las células $4n$ son seleccionadas negativamente durante el desarrollo de los tejidos fetales (Lu y Market, 1980), pero persisten en las membranas extraembrionarias (Tarkowsky y col., 1977). Rossant y col. (1982) sugirieron la importancia del genotipo trofoblástico para la sobrevivencia de las quimeras (Rossant y col., 1982). En su experiencia, las quimeras murinas interespecíficas entre *Mus musculus* y *Mus caroli* generadas por inyección de MCI en blastocistos, únicamente producían descendencia viable cuando el genotipo *Mus musculus* del TrE se correspondía con el de la madre sustituta. Entonces, se sugiere que las interacciones trofoblasto-útero son fundamentales para la sobrevivencia de las quimeras luego de su implantación y que los componentes del trofoblasto de *Mus musculus* estarían protegiendo a las células de *Mus caroli* del rechazo inmunológico materno.

Existen dos métodos básicos para la generación de embriones $4n$: el uso de citocalasina B (Tarkowsky y col., 1977; Ueda y col., 1995) y la electrofusión (Curnow y col., 2000; Suo y col., 2009). La citocalasina B inhibe la división citoplasmática, pero

permite la división nuclear (Carter, 1967). Sin embargo, tienen altas tasas de mosaicismo entre embriones $2n$ normales y $4n$ (Tarkowski y col., 1977). En cambio, la electrofusión ha producido una población de células $4n$ mucho más homogénea en otras especies, como el ratón y el conejo.

Según Snow, los embriones murinos $4n$ permiten una implantación rápida, pero unos pocos llegan a término (Snow, 1975). Sin embargo, los últimos avances en las técnicas y medios de cultivo han permitido obtener tasas de desarrollo a blastocisto semejantes a las de los embriones normales en bovinos (Curnow y col., 2000).

Varios intentos han sido reportados en ovinos y bovinos para mejorar la placentación de los animales clonados, mediante la producción de embriones quiméricos, pero los resultados de nacimientos no variaron respecto de la clonación tradicional (Saito y col., 2003; Boediono y col., 1999; Iwasaki y col., 2000; Murakami y col., 2006). Contrariamente, en ratón se han observado buenas tasas de desarrollo usando CM (con impronta normal) con complementación trofoblástica (Eggan y col., 2001; Li y col., 2005).

En las placentas bovinas existen naturalmente células binucleadas. Éstas se localizan en todo el TrE, generalmente en asociación con uniones por microvellosidades que separan el trofoblasto del epitelio materno (Duello y col., 1986). De la misma manera, la frecuencia de células poliploides en el disco embrionario y en el TrE de embriones día 7 producidos *in vitro* es del 50%; mientras que disminuye al 20% en embriones producidos *in vitro* que fueron transferidos tempranamente a úteros de vacas receptoras. En este último caso, los análisis estadísticos reflejan que la distribución de las células poliploides es significativamente mayor en el TrE que en el disco embrionario (Viuff y col., 2002).

Recientemente han sido reportados nacimientos de ratones adultos generados a partir de la agregación de células somáticas inducidas a la indiferenciación o iPSc (del inglés, *induced pluripotent stem cells*) y células $4n$ (Boland y col., 2009). Estos agregados fueron quimeras transitorias, dado que las crías nacidas estuvieron constituidas

únicamente por células $2n$, sosteniendo el diseño experimental de nuestro trabajo en el Capítulo VI.

1.2.5. *Criopreservación de embriones*

La criopreservación de embriones se encuentra relacionada con la TE y la PIV. Se trata de una estrategia ampliamente utilizada, ya que permite el almacenamiento potencialmente infinito de embriones para que puedan ser comercializados y transferidos en el momento más oportuno (Sudano y col., 2012). Los primeros mamíferos criopreservados satisfactoriamente correspondieron a ratones (Whittingham y col., 1972) y, un año después, fue reportado el primer nacimiento de un embrión bovino congelado (Wilmut y Rowson, 1973). Desde entonces, fueron desarrollados nuevos protocolos basados en dos técnicas principales: el congelamiento tradicional y la vitrificación.

El nitrógeno líquido a -196°C es el medio de elección para conservar embriones criopreservados. Se considera que los embriones pueden ser mantenidos 200 años sin afectar su viabilidad ni causar daños genéticos (Mazur y Schneider, 1986). Sin embargo, durante la criopreservación, los embriones sufren daños cuya severidad depende de factores como el tamaño y la forma de las células, la permeabilidad de las membranas y la calidad y sensibilidad de la estructura que sufre el proceso (oocito o embrión) (Vajta y Kuwayama, 2006). Para minimizar estos problemas se emplean agentes crioprotectores, que son solutos orgánicos que ayudan a proteger las organelas celulares; aunque muchas veces perjudican la organización del citoesqueleto, resultan tóxicos o generan un daño osmótico (Dobrinsky, 2002). Se han realizado varios intentos para disminuir la toxicidad y aumentar la permeabilidad de los agentes crioprotectores, usando combinaciones de los mismos, adicionándolos en distintos puntos del proceso y congelando las muestras con alta concentración de los mismos (Vajta y Kuwayama, 2006). Entre los crioprotectores más usados se encuentra el dimetil-sulfóxido (DMSO), el etilenglicol (EG) y el glicerol (G). Asimismo, se ha observado que los azúcares como la glucosa, la tehalosa y otros glúcidos pueden actuar como criopreservantes naturales (Wakayama y col., 2008).

Una de las principales limitantes de la aplicación masiva de la criopreservación de embriones de PIV ha sido su mayor sensibilidad a la criopreservación con respecto a aquellos embriones producidos *in vivo* (Leibo y Loskutoff, 1993), posiblemente debido a su mayor contenido lipídico (De La Torre-Sánchez y col., 2006a; 2006b; Mucci y col., 2006; Barceló-Fimbres y Seidel, 2007). Asimismo, los embriones producidos *in vivo*, tanto congelados como vitrificados, tienen tasas de preñeces semejantes para ambas técnicas; mientras que los embriones de PIV toleran mejor la vitrificación (Inaba y col., 2011). Otro factor que afecta la eficiencia de la criopreservación es el estadio del desarrollo embrionario en el cual se realiza el proceso (Massip, 2001), siendo el blastocisto expandido el estadio más conveniente (Han y col., 1994; Hasler y col., 1995).

1.2.5.a. Congelamiento tradicional

Actualmente, el congelamiento tradicional es la técnica de criopreservación de mayor difusión. El procedimiento se encuentra totalmente estandarizado y automatizado por equipamientos comerciales. Durante el congelamiento, la velocidad de disminución de la temperatura permite el intercambio de crioprotectores ente los espacios intra y extracelulares. El control de la velocidad de enfriamiento permite que el agua extracelular cristalice, aumentando el gradiente osmótico que extrae el agua dentro de la célula (Saragusty y Arav, 2011) y eliminando casi completamente la formación de hielo intracelular que dañaría severamente los componentes celulares. Los embriones congelados son fácilmente transferibles tras realizar el descongelamiento de la pajuela donde se encuentran conservados durante unos minutos en agua a 37°C. Las tasas de supervivencia de las muestras producidas *in vivo* por SOV e IA suelen ser altas y los embriones sobreviven intactos.

1.2.5.b. Vitrificación

La vitrificación es una técnica de criopreservación de embriones y oocitos altamente utilizada, principalmente en condiciones experimentales. Se consigue mediante un enfriamiento muy rápido en una solución cuya viscosidad aumenta con el descenso de temperatura hasta la formación de un estado sólido amorfo, sin estructura cristalina u organizada. El procedimiento consiste en conseguir un contacto directo entre la solución

vitrificante (con el agente crioprotector) y el nitrógeno líquido. Para lograr un gran cambio de temperatura a gran velocidad (enfriamiento ultrarrápido, mayor a 500 °C/min) se usa un volumen mínimo de medio (reportado entre 0,1 y 1 µL) y nitrógeno líquido a -196°C. La exposición y las tasas de congelación deben ser lo suficientemente rápidas para evitar la toxicidad y la formación de cristales intracelulares que puedan dañar el contenido celular. Antes del calentamiento, el material biológico debe equilibrarse con la solución crioprotectora (en menor concentración) para que pueda soportar el choque osmótico.

Existen diferentes técnicas de vitrificación de embriones, basadas en los mismos principios y prácticamente sin ventajas entre ellas. Con el objetivo de minimizar el volumen de medio congelado y garantizar un enfriamiento ultrarrápido surgieron las técnicas de redes o rejillas de microscopía electrónica (Martino y col., 1996), las pajuelas abiertas y estiradas (OPS, del inglés *open pulled straws*) (Booth y col., 1999), los bucles de congelamiento o *cryoloops* (Lane y col., 1999) y el método de *CryoTip*® (Kuwayama y col., 2005). El método de vitrificación en superficie sólida (SSV, del inglés *solid surface vitrification*) (Dinnyés y col., 2000) evita la formación de vapores.

La vitrificación no requiere de aparatos de congelamiento ni de alto entrenamiento, y principalmente elimina el riesgo de daños celulares debido a que las altas velocidades de enfriamiento y calentamiento no dan tiempo a que ocurran. Por lo tanto, se trata de una técnica con características competitivas respecto del congelamiento tradicional. Sin embargo, las desventajas de la vitrificación radican en el impedimento para hacer transferencia directa de los embriones preservados (Vajta y Kuwayama, 2006), la posibilidad de transmisión de enfermedades durante el contacto con nitrógeno líquido no estéril (Bielanski y col., 2000) y la ausencia de un protocolo estandarizado (Vajta y Kuwayama, 2006).

Durante el desarrollo de la presente Tesis, los objetivos individuales buscaron desarrollar una nueva forma de clonación embrionaria a partir de la separación de blastómeras de un único embrión producido por FIV, sin la necesidad de emplear un equipo de micromanipulación. Varios años atrás se intentaron multiplicar embriones por enucleación y TN, pero estas iniciativas no prosperaron debido a la complejidad de los métodos empleados. En la actualidad, con el desarrollo de nuevos conocimientos en términos de clonación animal, complementación trofoblástica y técnicas LZP ha sido posible combinar diversas estrategias para lograr desarrollar un sistema de clonación embrionaria.

En primera instancia, en el Capítulo II se desarrollaron ensayos de FIV, dado que fue la principal tecnología planteada para las posteriores experiencias. En este sentido, también se efectuaron ensayos *in vivo* de TE de los embriones producidos *in vitro* para evaluar tanto la calidad de los embriones producidos como la validez de la técnica bajo nuestras condiciones. De esta manera, fue posible corroborar la calidad de los blastocistos obtenidos, generando preñeces que aún se encuentran en curso.

En el Capítulo III se evaluó la implementación de FIV con semen sexado, desde dos puntos de vista. Por un lado, como una alternativa para el mercado celular de las quimeras; y, por el otro, con la potencialidad de conseguir multiplicar embriones del sexo deseado. Además, los resultados del sistema de producción de embriones *in vivo* por SOV, IA con semen sexado y TE fueron comparados con los resultados obtenidos *in vitro* por FIV empleando semen sexado, para validar el empleo de este tipo de semen en ensayos de laboratorio.

En los Capítulos IV y V se implementó una técnica de vitrificación de embriones, innovando especialmente en aquellos embriones LZP producidos en la presente Tesis. Esto permitirá criopreservar este tipo de embriones para realizar las TE en el momento de disponibilidad de hembras receptoras.

En los Capítulos V y VII se analizaron dos estrategias de multiplicación de embriones LZP, basadas en la transferencia de ooplastos (TO) seguida de desagregación de blastómeras y la desagregación y complementación con embriones tetraploides para la producción de quimeras transitorias, respectivamente. Asimismo, se estudió el desarrollo de blastómeras individuales de embriones en estadio de 2 a 8 células y se discutieron algunas cuestiones referentes al desarrollo embrionario, como la presencia de factores en el oocito y la AGE.

Finalmente, en el Capítulo VI también se aplicó la técnica de transgénesis mediada por vesículas de ooplasma coincubadas con un transgén, desarrollada por Pereyra-Bonnet y col. (2011). El objetivo del trabajo consistió en emplear la transgénesis principalmente como herramienta de marcado celular. Las quimeras se plantearon específicamente como un sistema transitorio para la multiplicación de blastómeras individuales de embriones bovinos (incapaces de alcanzar el estadio de blastocisto independientemente) (Capítulos V y VI), generadas mediante el procedimiento de complementación trofoblástica.

Por lo tanto, el sistema de quimeras transitorias representó una forma innovadora de clonación embrionaria. De esta manera, se consiguió desarrollar un sistema de producción, multiplicación y criopreservación de los embriones producidos por FIV y LZP, que facilitaría una plausible aplicación a campo.

1.3. HIPÓTESIS

“A partir de una blastómera en estadio de 8 células es posible producir embriones viables, permitiendo desarrollar una técnica eficiente de clonación embrionaria”.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. *Objetivos generales*

- Generar un sistema de producción y criopreservación de embriones de fecundación *in vitro* (FIV) con semen convencional y sexado para ser implementado en los siguientes experimentos bajo nuestras condiciones.
- Multiplicar genética de interés, permitiendo obtener numerosos embriones a partir de uno de gran valor genético, generando un sistema simple de “clonación embrionaria”.
- Reducir las tasas de mosaicismo y ampliar el número de embriones bovinos transgénicos mediante desagregación de blastómeras y complementación con embriones tetraploides/asincrónicos de FIV.

1.4.2. *Objetivos específicos*

1.4.2.a. *Objetivos específicos del Capítulo II:*

- Testear el mejor semen a emplear para FIV, comparando las tasas de producción de embriones a partir de diferentes toros.
- Validar la calidad de los embriones producidos por FIV, realizando transferencia embrionaria (TE) de blastocistos producidos por aspiración folicular (OPU) y FIV.

1.4.2.b. *Objetivos específicos del Capítulo III:*

- Evaluar, mediante un protocolo corto (5h) de FIV, la calidad del semen sexado hembra de partidas nacionales e importadas respecto de su contraparte convencional.
- Evaluar la producción de embriones *in vitro* a partir de pajuelas de semen sexado de diferentes toros, para su potencial aplicación como una herramienta de marcado celular.

- Comparar el uso del semen sexado en protocolos de superovulación (SOV) e inseminación artificial (IA) con la FIV, evaluando la variabilidad de los machos en cada condición.

1.4.2.c. Objetivos específicos del Capítulo IV:

- Emplear una técnica simple y económica de vitrificación de blastocistos cultivados libres de zona pelúcida (LZP) producidos por FIV.

1.4.2.d. Objetivos específicos del Capítulo V:

- Evaluar el efecto de la transferencia de ooplastos (TO) en el desarrollo y la calidad de embriones de FIV-LZP.
- Aumentar la capacidad de desarrollo de blastómeras individuales, después de la desagregación de embriones de producidos por TO para producir un sistema innovador de “clonación embrionaria”.

1.4.2.e. Objetivos específicos del Capítulo VI:

- Establecer las mejores condiciones de fusión para la generación de embriones tetraploides (4n).
- Utilizar la transgénesis con una construcción plasmídica conteniendo el gen reportero de la proteína verde fluorescente (*egfp*) como una herramienta de marcado celular.
- Multiplicar embriones mediante la agregación de blastómeras que expresen *egfp* con embriones 4n y/o asincrónicos no valiosos, en el sistema de cultivo en micropozos en placa (WOW), para generar un sistema eficiente de “clonación embrionaria”.

CAPITULO II.

FECUNDACIÓN *IN VITRO* CON SEMEN CONVENCIONAL

- Los resultados de testeo de semen forman parte del Informe Técnico: “Evaluación de calidad seminal mediante fertilización *in vitro*”, realizado para la evaluación de partidas de toros comerciales. Este informe fue presentado a la empresa Ciale-Alta, el 10 de diciembre de 2012.

2.1. RESUMEN

El éxito de la FIV depende de tres procesos individuales interconectados: (a) la maduración *in vitro* de los oocitos aspirados, (b) la capacitación del semen fuera del tracto genital femenino, previa a la fecundación propiamente dicha y (c) el cultivo embrionario *in vitro*. Los objetivos de este capítulo consistieron en testear el mejor semen a emplear para FIV y validar la técnica a través de la transferencia a hembras receptoras de los embriones producidos mediante OPU y FIV. Los experimentos realizados permitieron determinar que, al realizar el testeo de semen de 4 toros (A, B, C y D), existió un efecto macho que afectó la PIV. Sin embargo, se obtuvieron tasas de desarrollo hasta blastocisto cercanas al 50% para los toros A y C. La TE de embriones producidos por OPU y FIV permitió obtener buenas tasas de preñez. Por lo tanto, en nuestras condiciones, la FIV demostró tener gran aplicabilidad.

2.2. INTRODUCCIÓN

La PIV es una biotecnología reproductiva cuyos intereses exceden los fines comerciales. Con el progreso de las técnicas de embriología celular y molecular, los embriones de PIV son una herramienta de estudio sumamente interesante, permitiendo incluso la generación de embriones transgénicos (Pereyra-Bonnet y col., 2011; Bevaqqua y col., 2012; Hiriart y col., 2013) y el establecimiento de líneas de CM, con alta disponibilidad y bajos costos (Furusawa y col., 2013). A pesar de que el primer nacimiento de un embrión de FIV en Argentina se produjo en 1994 (Salamone y Barañaño, 1995), aún son pocos los laboratorios que realizan producción de embriones por FIV. Si bien se trata de una técnica altamente desarrollada y difundida en otros países, como Brasil y Estados Unidos (Stroud, 2012; Viana, 2012), requiere de personal capacitado que cuente con los conocimientos necesarios para llevar a cabo los procedimientos.

La principal ventaja de la FIV reside en los bajos costos, principalmente cuando se emplean oocitos provenientes de ovarios de vacas enviadas a faena (Aller y col., 2000). A su vez, la OPU guiada por ecografía permite realizar repetidas aspiraciones (incluso una vez por semana) de animales prepúberes, gestantes (hasta los 4 meses) y en posparto, acortando los tiempos biológicos y aumentando considerablemente la producción de embriones a partir de genética valiosa (Betteridge y col., 1989; Duby y col., 1996; García y Salaheddine, 1998; Taneja y col., 2000; Lopes y col., 2006; Ratto y col., 2011).

La FIV consiste en tres procesos interconectados: (a) la MIV de los oocitos aspirados, (b) la capacitación del semen fuera del tracto genital femenino, previa a la fecundación propiamente dicha y (c) el cultivo embrionario *in vitro*. Por un lado, la calidad de los complejos oocito-células del cúmulus (COCs) recolectados es importante para la MIV. Las células del cúmulus atraviesan la ZP y establecen uniones estrechas con el oocito. Por lo tanto, la presencia de un cúmulus completo con varias capas garantiza el pasaje de nutrientes del medio externo al oocito y permite que el oocito complete su MIV (Leibfried y First, 1979). Debido a la presencia de gonadotrofinas en el medio de maduración, el cúmulus del oocito se expande, facilitando el ingreso de los espermatozoides.

Morfológicamente, la presencia de un cúmulus expandido permite estimar la condición de oocito maduro.

Durante la aspiración folicular por OPU, varios factores pueden influir en la eficiencia de la técnica en el ganado vacuno, entre ellos la raza y el momento fisiológico del ciclo reproductivo de la hembra. Ha sido reportado que las razas Holando (*Bos taurus*) producen oocitos de mejor calidad que las vacas danesas rojas y blancas (Lopes y col., 2006). Sin embargo, las vacas Aberdeen Angus (*Bos taurus*) producen mayor número de oocitos con mejor competencia *in vitro* que las vacas Holando (Ratto y col., 2011). Asimismo, las razas índicas (*Bos indicus*) han permitido obtener mejores resultados en la PIV que las hembras *Bos taurus* (Pontes y col., 2010), permitiendo el gran desarrollo del procedimiento OPU y PIV en países como Brasil, que cuenta con este tipo de ganado (Viana, 2012). Por otro lado, el momento del ciclo estral en el cual se realiza la OPU influye tanto en las tasas de recuperación y la calidad de los oocitos, como también en los resultados de la FIV (Tan y Lu, 1990; Merton y col., 2003; Vassena y col., 2003). En este sentido, han sido reportadas varias estrategias para mejorar la eficiencia de la OPU. Por un lado, la sincronización de la emergencia de la onda folicular mejoró los resultados en vacas donantes mestizas Brangus tras la realización de la aspiración folicular 5 días después de un tratamiento de progesterona y estradiol (Reis y col., 2010). De la misma forma, en razas *Bos taurus*, la estimulación ovárica con gonadotrofinas permitió recuperar mayores tasas de oocitos (Blondin y col, 1997; 2002). Sin embargo, los beneficios de estos tratamientos aún continúan en debate.

Los espermatozoides deben sufrir el proceso de capacitación antes de adquirir la capacidad fecundante. En condiciones *in vitro*, esto se logra a través del uso de agentes capacitantes, cuyo mayor representante es la heparina, presente también en el tracto genital femenino (Brackett y Oliphant, 1975; Brackett y col., 1982; Parrish y col., 1986; 1988). Sin embargo, ha sido reportado un efecto macho (Aoyagi y col., 1988; Zhang y col., 2003), por lo cual es necesario el testeo del semen para su correcto uso en condiciones de FIV estándar (Xu y col., 2009). El siguiente paso consiste en la fecundación, que involucra la unión de los núcleos de ambas gametas y la formación del genoma del nuevo individuo. Este proceso

involucra tanto el pasaje a través de las células del cúmulus mediante la reacción acrosómica, el reconocimiento especie-específico entre la ZP y la membrana plasmática del espermatozoide y la fusión de las membranas de las gametas. La mayor parte del semen usado, tanto para IA como para FIV, es congelado. Ha sido reportado que el proceso de criopreservación puede causar daños en la membrana plasmática, el acrosoma, el metabolismo y la motilidad de los espermatozoides (Meyers, 2005; Blässe y col., 2012; Taşdemir y col., 2013). Asimismo, efectos relacionados al estrés por calor contribuyen a disminuir la fertilidad de los machos (Yaeram y col., 2006; Orgal y col., 2012). Tanto la motilidad espermática evaluada subjetivamente (incluso post-descongelación) como el número total y la proporción de espermatozoides morfológicamente normales han sido relacionados con la fertilidad (Rodríguez-Martínez, 2003; Christensen y col., 2011; Nagy y col., 2013).

La tercera etapa consiste en el cultivo *in vitro*, tanto de los presuntos cigotos generados como de los embriones que desarrollen a partir de ellos. Los medios de cultivo actualmente empleados permiten obtener altas tasas de formación de blastocistos a partir de FIV. Sin embargo, los embriones producidos *in vitro* varían significativamente con aquellos producidos *in vivo* por medio de IA o servicio natural. Por ejemplo, cuentan con distintos patrones de expresión génica y menor tolerancia a la criopreservación (Fair y col., 2001; Abe y col., 2002; Rizos y col., 2002; Concoran y col., 2006; Sudano y col., 2011). Dichas características han sido atribuidas a las condiciones de cultivo *in vitro*, por lo que actualmente se está investigando la producción de embriones *in vitro* con características más semejantes a las de los embriones *in vivo* (Keskinetepe y Brackett, 1996; Seidel, 2006; Sudano y col., 2011).

Por los motivos expuestos anteriormente, en el presente capítulo se planteó la realización de FIV, tanto para el testeo del macho a emplear usando COCs colectados de ovarios de matadero, como para validar la técnica a nivel práctico, colectando COCs por OPU y permitiendo demostrar la calidad de los embriones obtenidos tanto en ensayos *in vitro* de producción de embriones como en las tasas de preñez alcanzadas en las transferencias de los mismos a hembras receptoras.

2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

2.3.1. Experimento 1. FIV con semen convencional no sexado

Se evaluaron muestras de las mismas partidas de semen congelado de 4 toros (A, B, C y D) de la empresa Ciale-Alta. En todos los casos se realizaron 2 repeticiones, comparando los 4 toros simultáneamente, evitando así la variabilidad generada por los oocitos de matadero empleados.

2.3.2. Experimento 2. TE producidos in vitro con semen convencional no sexado a partir de oocitos recuperados por OPU

Se recuperaron oocitos de vacas donantes de la raza Holando de alto mérito genético, previamente estimuladas a la superovulación o aspiradas en cualquier momento de la onda folicular, en una cabaña de Colonia Aldao (Santa Fe, Argentina). Se procedió a madurar y fecundar *in vitro* los oocitos obtenidos, empleando semen convencional. Los blastocistos obtenidos se transfirieron a vacas receptoras previamente sincronizadas. Se evaluaron las tasas de clivaje, de producción de blastocistos y de preñez aproximadamente a los 35 días de la PIV.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. *Productos químicos*

Todos los productos químicos y los medios fueron adquiridos de *Sigma Chemical* (St. Louis, MO, EE.UU.), a menos que se indique lo contrario.

2.4.2. *Colección y maduración de oocitos de matadero*

Los ovarios provinieron de vacas enviadas a faena en mataderos de las provincias de Buenos Aires y Santa Fe (Argentina). Los COCs se aspiraron de folículos de 2 a 6 mm de diámetro y se recolectaron en medio Tyrode tamponado con HEPES (H4034) conteniendo albúmina, lactato y piruvato (TALP-H) (Bavister y Yanagimachi, 1977). Para la MIV, se seleccionaron oocitos cubiertos con al menos 3 capas de células del cúmulus. La maduración se realizó en medio TCM-199 (31100-035, Gibco, Grand Island, NY, EE.UU.), suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (SFB, 013/07; Internegocios, Buenos Aires, Argentina), 10 µg/mL de FSH (Folltropin®, Bioniche, East Belleville, Ontario, Canadá), 0,3 mmol/L de piruvato sódico (P2256), 100 mmol/L cisteamina (M9768) y 2% v/v de antibiótico-antimicótico (ATB, 15240-096, Gibco, Grand Island, NY, EE.UU.). Los oocitos se cultivaron en gotas de 100 µL de medio TCM suplementado, cubiertas con aceite mineral (M8410), en placas de cultivo de 32 mm. Las condiciones de MIV consistieron en 6,5% de CO₂ en aire humidificado a 39°C durante 22 h.

2.4.3. *Estimulación de vacas donantes de oocitos para OPU*

En el día 0 del protocolo de estimulación de vacas donantes de oocitos se colocaron implantes de 1,9 g de progesterona (CIDR, Pfizer, NY, EE.UU.) y se inyectaron 2 mL (2 mg) de 17-β-estradiol (Río de Janeiro, Argentina) y 2 mL (500 µg) de prostaglandina (Veteglan, Calier, España). En el día 3 por la tarde y en el día 4 por la mañana se inyectaron 3 mL de FSH (Folltropin®, Bioniche, East Belleville, Ontario, Canadá), respectivamente. Posteriormente, en el día 4 por la tarde y día 5 por la mañana se inyectaron otros 2 mL de FSH en cada aplicación; en el día 6 por la tarde se retiró el dispositivo de progesterona. Finalmente en el día 7 por la mañana se procedió a realizar la punción folicular.

2.4.4. *Recuperación de oocitos in vivo por OPU*

En el día 7 del protocolo de estimulación de vacas Holando donantes de oocitos para OPU se realizó la punción folicular en un campo en Colonia Aldao (Santa Fe, Argentina), empleando un ecógrafo Mindray 6600, un transductor microconvexo, 100 mmHg de presión de vacío y una aguja de 50 x 18G. Las vacas no estimuladas fueron aspiradas directamente sin tratamiento previo. El contenido folicular se recolectó en un tubo de 50 mL, protegido de la luz solar.

2.4.5. *Colección y selección de los oocitos recuperados por OPU*

El material aspirado, contenido en un tubo de 50 mL debidamente rotulado, fue filtrado y enjuagado con medio PBS (solución salina tampón fosfato Dulbecco) hasta que su contenido sanguinolento quedó transparente. Se avirtió el contenido del filtro en una placa de búsqueda, enjuagando correctamente para que no perder muestras. Se colectaron todos los oocitos y se colocaron en una placa con medio TALP-H. Los oocitos se contaron, clasificaron y se colocaron en una placa con medio TCM-199 suplementado para su MIV, en condiciones estándar (Sección 2.4.2.).

2.4.6. *Fecundación in vitro*

El procedimiento de fecundación *in vitro* ha sido descrito previamente por Brackett y Oliphant (1975). Resumiendo, el semen congelado se descongeló en un baño térmico de agua a 37°C durante 30 seg. El espermatozoide se lavó dos veces por centrifugación a 490 g con el medio definido por Brackett-Oliphant (BO). La concentración de espermatozoides convencionales no sexados se ajustó a 16×10^6 espermatozoides/mL y el espermatozoide fue posteriormente coincubado durante 5 h con los oocitos maduros con cúmulus expandidos en el medio BO. Posteriormente, los presuntos cigotos se lavaron varias veces en TALP-H y se cultivaron *in vitro* como se describe en la sección 2.4.7.

2.4.7. *Cultivo in vitro*

Los presuntos cigotos se cultivaron en gotas de 50 μ L de fluido oviductal sintético (SOF) (Tervit y col., 1972; Holm y col., 1999), suplementado con 2,5% v/v de SFB. Las condiciones de cultivo fueron 6,5% de CO₂ en aire humidificado a 39°C. Los embriones se

transfirieron a nuevas gotas en el día 2 y se suplementaron con 10% de SFB en el día 5. El clivaje se evaluó en el día 2 y el desarrollo a blastocistos al día 7.

2.4.8. *Sincronización de hembras receptoras*

Las vacas receptoras de embriones fueron sincronizadas con dos dosis de 2 mL cada una de prostaglandina. La segunda inyección fue realizada 3 días antes de la FIV. La primera dosis fue administrada entre 11 y 14 días antes de la fecha fijada para la FIV. Se controló celo el día de la FIV y los días anterior y posterior (receptoras con útero de días 7, 8 y 6, respectivamente para el día de la TE).

2.4.9. *TE producidos por OPU y FIV*

Los blastocistos día 7 producidos por FIV de oocitos recuperados por OPU fueron cargados individualmente en pajuelas de 0,25 mL en medio SOF o medio *Syngro Holding* (Bioniche, East Belleville, Ontario, Canadá). La TE se realizó de forma ipsilateral en el cuerpo uterino, en receptoras que presentaban un cuerpo lúteo mayor a 18 mm.

2.4.10. *Análisis estadístico*

El desarrollo embrionario se analizó con el procedimiento GENMOD de SAS 9.1 (SAS, 2003) con una distribución binomial y un enlace logit. Los modelos logísticos incluyeron los efectos fijos de tratamiento y las interacciones de segundo y tercer orden. Se emplearon contrastes ortogonales para evaluar diferencias entre tratamientos. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$.

2.5. RESULTADOS

2.5.1. FIV con semen convencional no sexado

Los resultados globales de 2 repeticiones de producción de embriones por FIV con semen convencional a partir del semen de los 4 toros evaluados se muestran en la Tabla 1. Las tasas de clivaje fueron aceptables en los 4 casos evaluados, sin presentar diferencias significativas. Las tasas de desarrollo *in vitro* hasta estadio de blastocisto fueron mayores ($P < 0,05$) empleando los toros A y C (37/84, 44% y 41/85, 48%, respectivamente). Los toros B y D disminuyeron la producción de embriones (39/91, 33% y 25/92, 27%, respectivamente).

Tabla 1. Resultados globales de FIV para los toros analizados. Se presentan los datos globales correspondientes a 2 repeticiones independientes de FIV para cada toro evaluado.

Toro	Nro. oocitos cultivados	Clivaje (%)	Nro. blastocistos totales (%)	Blastocistos/clivados (%*)
A	84	65 (77)	37 (44)a	37/65 (57)a
B	91	65 (71)	30 (33)b	30/65 (46)b
C	85	68 (80)	41 (48)a	41/68 (60)a
D	92	62 (67)	25 (27)b	25/62 (40)b
TOTAL	352	260 (74)	133 (38)	133/260 (51)

* Porcentajes calculados respecto del número de embriones clivados; (a,b,c): Valores con distintas letras difieren significativamente ($P < 0,05$).

2.5.2. *TE producidos in vitro con semen convencional a partir de oocitos recuperados por OPU.*

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos a partir de procedimientos de recuperación de oocitos por OPU y FIV con semen convencional no sexado para ensayos realizados a campo. Una menor cantidad de oocitos fue recuperada de las vacas estimuladas, respecto de las no estimuladas. No hubo diferencias significativas en las tasas de clivaje, producción de blastocistos y preñez.

Tabla 2. TE producidos *in vitro* con semen convencional y oocitos recuperados por OPU. Vacas donantes de oocitos para OPU fueron estimuladas a la ovulación. El grupo control consistió en vacas aspiradas en cualquier momento de la onda folicular.

Tratamiento	Nro. vacas aspiradas	Nro. oocitos obtenidos	Promedio oocitos/OPU	Clivaje (%*)	Nro. de blastocistos (%*)	Nro. de preñeces a los 35 días (%**)
Estimulación	14	65	4,6	44 (68)	27 (41)a	9 (33)***
Ninguno	8	87	10,8	53 (61)	21 (24)b	8 (38)
TOTAL	22	152	6,9	97 (64)	48 (32)	17 (35)

*Porcentajes en relación al número de oocitos obtenidos;**Porcentaje en relación al número de blastocistos transferidos; ***Preñeces confirmadas a los 70 días. (a,b): Valores con distintas letras difieren significativamente (P<0,05).

2.6. DISCUSIÓN

La FIV es una herramienta sumamente útil para la producción de embriones *in vitro*. En nuestras condiciones ha demostrado tener una alta eficiencia, no solo para la evaluación de semen, sino también para producir embriones que posteriormente son sometidos a transgénesis o clonación (Pereyra-Bonnet y col., 2011; Bevacqua y col., 2012; 2013; Hiriart y col., 2013).

Como se mencionó anteriormente, la FIV consiste en tres etapas cuyos resultados individuales pueden afectar significativamente el proceso global. La calidad ovocitaria es de fundamental importancia en este sentido. En nuestra primera experiencia, se realizaron ensayos de FIV que presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en cada repetición independiente (Tabla 1), siendo la primera de ellas mejor que la segunda. Dado que los procedimientos fueron realizados desde octubre a diciembre, el fenómeno de disminución de la PIV podría estar directamente relacionado con las condiciones climáticas (época de calor). A pesar de que el bovino no es una especie estacional, las altas temperaturas afectan la ovogénesis tanto como 105 días antes de la ovulación (Torres-Júnior y col., 2008) y por lo tanto, producen efectos adversos en el oocito y en el embrión temprano (Hansen, 2013) que finalmente alteran las tasas de preñez. Al mismo tiempo, otro factor de variabilidad es el estado de desarrollo de los ovarios de las hembras empleadas. El hecho de trabajar con ovarios provenientes de mataderos limita las posibilidades de escoger las hembras donantes de oocitos. En este sentido, ha sido previamente reportado que los oocitos de terneras no presentan resultados repetibles, comparados con los oocitos de vacas (Salamone y col., 2001).

Por otro lado, la calidad espermática es otro de los componentes a evaluar para el éxito de la FIV. Existen variaciones considerables entre las distintas partidas congeladas del mismo macho, ya sea en morfología o motilidad. En cualquier eyaculado siempre existen alteraciones morfológicas, pero que difieren en su impacto sobre la fertilidad. Los defectos que afectan la fecundación o el posterior desarrollo embrionario (Rodríguez-Martínez y Barth, 2007) son denominados alteraciones mayores, mientras que otras anomalías pueden

no tener efectos. Para limitar esta variabilidad en cada procedimiento de congelado, las empresas comerciales cuentan con valores mínimos aceptables de las evaluaciones de las muestras. En este caso, el semen a ser procesado por la empresa Ciale-Alta debía contar con un mínimo de espermatozoides vivos con motilidad progresiva de 60% en fresco y 40% post-descongelado. Asimismo, la muestra requería de 70% de espermatozoides normales, con un mínimo del 20% en anomalías mayores. Sin embargo, esta evaluación permite normalizar parcialmente los resultados posteriores. Al igual que los oocitos, los espermatozoides pueden dañarse durante el proceso de espermatogénesis debido a diferentes condiciones de estrés. Ha sido previamente reportado que semen fresco colectado durante épocas de calor no sufre alteraciones de motilidad aparentes. Sin embargo, disminuye considerablemente su criotolerancia y sobrevida post-descongelado (Orgal y col., 2012). Sin embargo, no fue posible observar una interacción entre los toros empleados y cada repetición realizada. De esta manera, el semen de los toros empleados mostró el mismo comportamiento en ambas repeticiones.

Por otro lado, la combinación de los patrones de motilidad con los resultados de IA permiten dar un estimativo de la fertilidad (Januskauskas y col., 2001). Sin embargo, los ensayos de evaluación de la calidad seminal de semen convencional congelado mediante FIV brindan otro tipo de información, dado que las condiciones son muy diferentes a las naturales (Rodríguez-Martínez, 2007b). En nuestras condiciones, la FIV ha permitido determinar que los cuatro toros testeados (A, B, C y D) son aptos para la producción de embriones *in vitro*, dado el alto porcentaje de blastocistos obtenidos. Específicamente, los toros A y C demostraron una capacidad individual significativamente mayor ($P < 0,05$) que los toros B y D de fecundar oocitos de vacas de matadero *in vitro*. El efecto macho es una condición que limita el uso de cualquier semen en FIV, pero que puede corregirse mediante un patrón individual de agente capacitante para cada toro, indicando que el problema de la falla en la FIV no corresponde a los espermatozoides *per se*, sino que radicaría en el proceso de capacitación fuera del tracto reproductivo de la hembra (Lu y Seidel, 2004; Xu y col., 2009). En nuestro laboratorio es común emplear conjuntamente el semen de dos toros distintos para evitar el efecto macho y aumentar las tasas de desarrollo de embriones hasta estadio de blastocisto. En cuestiones comerciales, esta práctica se ve dificultada por

regulaciones al momento de inscribir legalmente las crías obtenidas ante los entes correspondientes, pero resulta de gran utilidad con fines científicos. Sin embargo, las tasas de producción de embriones *in vitro* de los toros A y C fueron similares a aquellas tasas obtenidas por combinación de toros en nuestras condiciones, lo que representa que estos machos pueden ser utilizados con éxito en procedimientos de FIV estándar con un solo semen.

Algunos autores afirman que la estimulación ovárica con gonadotrofinas mejora la eficiencia de OPU en hembras *Bos taurus* (Blondin y col., 2002). Asimismo, el tratamiento con FSH antes de la OPU ha mejorado el número de embriones viables después de cada sesión (Driancourt, 2001). Sin embargo, dados los resultados controvertidos respecto de la fase folicular ideal para realizar la OPU (Salamone y col., 1999; Merton y col., 2003; Vassena y col., 2003), aún continúa en controversia la sincronización de la onda folicular para realizar la aspiración. En nuestras observaciones, la estimulación de las donantes con gonadotrofinas tendió a disminuir la cantidad de oocitos recuperados en cada sesión de OPU, posiblemente por contar con folículos de gran tamaño en el día 7. Sin embargo, la tasa de blastocistos aumentó significativamente en las hembras estimuladas, indicando posiblemente un efecto favorable en la calidad ovocitaria que influiría de manera positiva en la producción de embriones, tal como ha sido previamente descrito por algunos autores (Chaubal y col., 2007; De Roover y col., 2008). Las tasas de preñez fueron muy buenas y no variaron significativamente, demostrando la calidad de los embriones producidos.

Al comparar los resultados globales de la FIV de oocitos provenientes de ovarios de matadero o de aspiración folicular, los porcentajes de clivaje y desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto descienden levemente (74 y 38% versus 64 y 32%, respectivamente para cada condición de FIV). Esto se debe a que en condiciones de frigorífico se realiza una selección más estricta en la calidad ovocitaria, dada la alta disponibilidad de oocitos. Sin embargo, las tasas de blastocistos/embriones clivados se conservan (51 versus 49%, respectivamente), sugiriendo que la técnica de FIV es altamente eficiente en ambas condiciones.

Con todo lo expuesto es posible demostrar que la FIV representa una potente herramienta para la producción de embriones de alto valor genético, con resultados alentadores respecto de la generación de blastocistos y las tasas de preñez. Esto representa que, bajo nuestras condiciones y seleccionando el macho, la FIV permite producir embriones de alta calidad embrionaria. Por lo tanto, las experiencias realizadas estarían validando no solo la técnica de OPU y FIV comercial, sino también el material de partida para la aplicación de los distintos experimentos desarrollados en esta Tesis.

CAPÍTULO III.

PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VIVO* E *IN VITRO* EMPLEANDO SEMEN SEXADO

- Los datos de fecundación *in vitro* con semen sexado fueron presentados en el 1° Congreso Internacional de la Sociedad Argentina de Tecnologías Embrionarias (SATE), realizado en la ciudad de Corrientes, Argentina, del 11 y 12 de abril de 2013, en formato de póster. **Hiriart MI**, Henzenn HI, Cavallero JM, Cavallero LM, Nigro M, Salamone DF. Producción de embriones bovinos sexados hembra mediante un protocolo corto (5h) de FIV.
- Los datos de fecundación *in vitro* con semen sexado junto con el análisis de recuperación de embriones *in vivo* forman parte del trabajo “Sistema de producción, multiplicación y conservación de embriones bovinos generados por fertilización *in vitro* con semen sexado hembra”, premiado como **Mención de honor: BARBERIS Y CAVALLERO S.A.** Rubro: Tecnología aplicada a la producción de carne y leche. Manejo (Categoría: Empresas) por el Centro Internacional de Innovación en Tecnología Agropecuaria (CiTA), en Capital Federal en julio de 2013.

3.1. RESUMEN

La FIV consiste en fecundar oocitos maduros fuera del tracto genital femenino. El sexado de semen se consigue mediante la separación y clasificación de los espermatozoides que contienen el cromosoma sexual X o el Y, según la diferencia de contenido de ADN total en el genoma haploide (aproximadamente 4% en bovinos), con más del 90% de pureza. Por otro lado, la inseminación artificial consiste en la técnica de elección para mejorar la genética y el desempeño reproductivo de los rodeos en nuestro país. En este capítulo se testeó la producción de embriones *in vitro* con semen sexado hembra y se la comparó con los resultados de producción de embriones *in vivo* por SOV e IA con el mismo tipo de semen; con el objetivo de contar con embriones de distinto sexo como herramienta de marcado celular. Las tasas de producción de embriones *in vivo* e *in vitro* no presentaron diferencias (30% frente a 27%, respectivamente). Sin embargo, los toros G e I produjeron tasas de 58 y 45% de PIV. En el mismo sentido, el uso de semen sexado para IA generó alta variabilidad, disminuyendo la repetitividad. Los resultados indicaron que, seleccionando el toro, la FIV con semen sexado aumenta los rendimientos por pajuela sexada y posibilita, por ejemplo, aumentar la producción de terneras en un rodeo lechero; imponiéndose tanto como una alternativa interesante y costo-efectiva para la producción de embriones con semen sexado a nivel comercial, como una estrategia de marcado celular en la generación de embriones quiméricos.

3.2. INTRODUCCIÓN

La obtención de embriones del sexo deseado resulta de importancia en la producción animal. El sexado de semen (Johnson y col., 1987; Johnson, 2000) consiste en dos procesos acoplados, llamados citometría de flujo y clasificación de células (Figura 5). En el citómetro de flujo los espermatozoides son separados individualmente para luego ser clasificados con más del 90% de pureza, según la diferencia de contenido de ADN de las células que contienen los cromosomas sexuales Y o X. En bovinos, la diferencia de ADN del genoma haploide del espermatozoide conteniendo el cromosoma X (hembra) es de aproximadamente 4% más que aquel con el cromosoma Y (macho) (Figura 6). Sin embargo, durante el proceso de sexado y crioconservado, los espermatozoides están expuestos a daños potenciales que afectan su integridad, la estructura de la membrana plasmática y del citoesqueleto, la sobrevivencia y motilidad post-descongelado, entre otros (Maxwell y col., 1996; Schenk y col., 1999; Boe-Hansen y col., 2005; Mocé y col., 2006). Las primeras crías producidas por FIV con semen sexado nacieron en 1993 (Cran y col., 1993). A partir de entonces, los avances en el área han permitido alcanzar niveles de desarrollo de embriones *in vitro* a partir de semen sexado comparables con los del semen convencional (Xu y col., 2006).

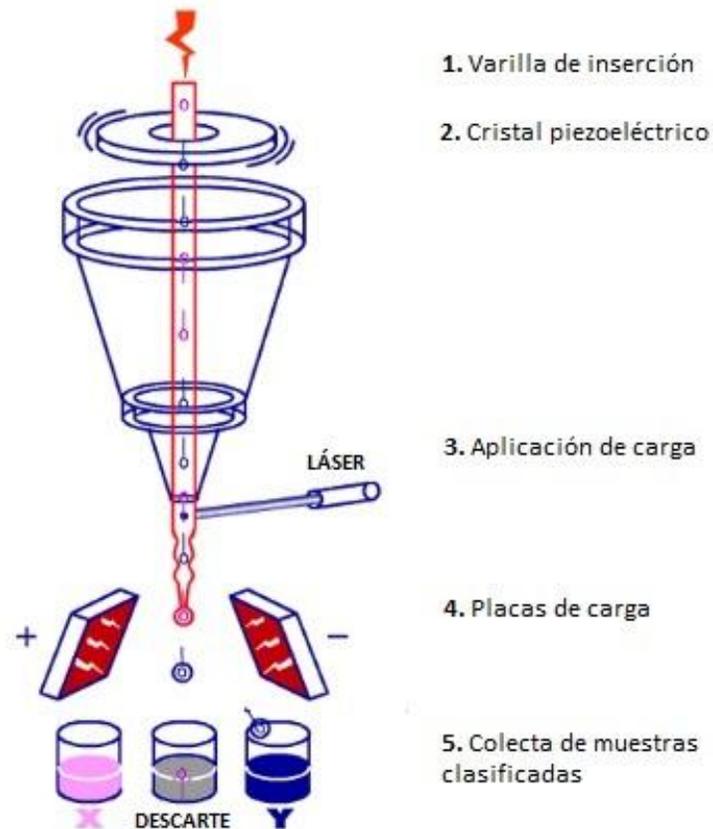


Figura 5. Proceso de sexado a través de citometría de flujo y clasificación de células.

(1) La muestra de espermatozoides es cargada en la varilla de inserción. (2) Un cristal piezoeléctrico es agitado a aproximadamente 90.000 veces por segundo, lo que permite la formación de gotas a partir de la muestra, con el objetivo de tener un espermatozoide en cada gota. La comparación de los espermatozoides que llevan los cromosomas sexuales X o Y es realizada por un criterio preestablecido. (3) Una carga es aplicada a cada gota. (4) Las gotas cargadas son desviadas a medida que atraviesan por las placas cargadas y se clasifican en reservorios separados, según contengan el cromosoma X o el Y. (5) Las partículas que no cumplen los criterios siguen derecho y son recolectadas en un tubo de descarte. (Modificado de *Sexing Technologies*;

<http://www.sexingtechnologies.com/articles/technique>).

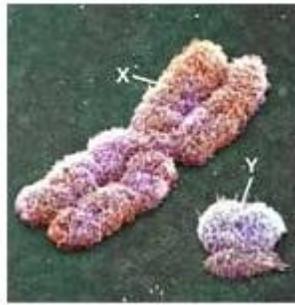


Figura 6. Fotografía obtenida a través de microscopía electrónica de barrido mostrando las diferencias de tamaño entre los cromosomas sexuales X e Y. En bovinos, los espermatozoides que portan el cromosoma X contiene aproximadamente 4% más de ADN que aquellas células con el cromosoma Y. Esta característica permite clasificar y separar los espermatozoides que contienen cada uno de estos cromosomas a través de citometría de flujo y clasificación celular (Obtenida de *Sexing Technologies*; <http://www.sexingtechnologies.com/articles/technique>).

Actualmente, el sistema más difundido para realizar TE en nuestro país es la producción de embriones *in vivo* por medio de SOV e IA. Para ello es necesario, en primer término, realizar la estimulación ovárica de la hembra donante de oocitos, que debe complementarse con un régimen óptimo de IA, utilizando semen de muy buena calidad (Seidel y col., 1999). Sin embargo, aunque se cumplan todos los requisitos, la respuesta superovulatoria resulta muy variable, manteniéndose en aproximadamente un 68% de hembras superovuladas que producen embriones transferibles (Donaldson, 1984), representando elevados costos para el proceso. En el mismo sentido, debido a todos los daños potenciales a los que se exponen los espermatozoides sexados resulta necesario desarrollar protocolos modificados del procedimiento de IA tradicional, como la inseminación uterina profunda, que requieren mayor entrenamiento (Seidel y col., 2000). Por otro lado, el semen congelado/descongelado comercialmente disponible exhibe menor tolerancia al estrés, reduciendo considerablemente las posibilidades de aplicar procesos de clasificación al semen ya criopreservado (Puglisi y col., 2006). De esta manera, las ventajas de la FIV con semen sexado (especialmente respecto de los rendimientos por

pajuela y las diferencias en las tasas de fertilidad) son evidentes (Carvalho y col., 2010; Stewart y col., 2011); especialmente cuando se combina con procedimientos de recuperación de oocitos por OPU, donde también se realiza una selección de la genética materna.

Como en la FIV con semen tradicional, también ha sido descrito un efecto macho para el caso del semen sexado (Xu y col., 2006; 2009), atribuyendo las diferencias en los resultados obtenidos a los diferentes grados de capacitación espermática alcanzados entre toros (Lu y Seidel, 2004). Dado que la heparina es el agente capacitante *in vitro* (Brackett y Oliphant, 1975; Brackett y col., 1982; Parrish y col., 1986; 1988), ha sido posible demostrar que la optimización individual de la concentración de heparina para cada toro problema podría incrementar las tasas de fertilidad y desarrollo de embriones *in vitro* (Lu y Seidel, 2004; Xu y col., 2009).

Por lo anteriormente expuesto, en el presente capítulo se evaluó la PIV por FIV con semen sexado hembra de diferentes toros y se compararon los resultados obtenidos con los de SOV e IA con semen sexado para la producción de embriones *in vivo*. La hipótesis de este trabajo residió en la posibilidad de emplear el semen sexado en FIV como una herramienta de marcado celular para la generación de quimeras, permitiendo identificar la contribución de cada sexo en el embrión agregado final, para su empleo en los siguientes experimentos planteados en esta Tesis.

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.3.1. Experimento 1. Recuperación de embriones in vivo producidos por SOV e IA con semen sexado hembra

Se analizaron los datos correspondientes a 20 tratamientos de SOV e IA con semen sexado hembra de 5 toros diferentes en distintas vacas donantes y establecimientos del país. Del toro H se usaron pajuelas sexadas con 10 millones de espermatozoides; mientras que de los toros L, M, N y O se emplearon pajuelas con 2 a 3 millones de espermatozoides sexados. Los datos analizados corresponden a procedimientos de campo realizados por la empresa Mario Nigro Transferencia de Embriones (La Plata, Buenos Aires, Argentina). Se evaluaron la producción *in vivo* de embriones transferibles (mórulas y blastocistos) y la variabilidad individual de cada toro.

3.3.2. Experimento 2. FIV con semen sexado hembra

Se analizaron muestras de semen sexado de seis toros sexados (E, F, G, H, I y J), junto con la contraparte de semen convencional para los toros E, F y G en repeticiones de fertilización y producción de embriones *in vitro*. Del toro H se usaron pajuelas comerciales con 10 millones de espermatozoides totales; mientras que las demás muestras sexadas contenían entre 2 y 3 millones de espermatozoides sexados totales. Se evaluaron las tasas de clivaje, producción de blastocistos y variabilidad individual de cada toro empleado.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. *SOV de hembras donantes de embriones para IA*

Todas las hembras donantes correspondieron a la raza Holando. En el día 0 del tratamiento se colocó un implante vaginal con progesterona y se aplicaron 100 mL de progesterona y 2,5 mL de 17- β -estradiol i.m. A partir del día 4, se aplicó FSH durante 4 días dividida en 8 aplicaciones en dosis decrecientes. Para cada vaca se utilizaron 20 mL con 400 mg de FSH. En los días 4 y 5 se aplicaron dosis de FSH de 4 y 3 mL i.m., respectivamente (una por la mañana y otra por la tarde). En el día 6, por la mañana se aplicó una dosis de 2 mL de FSH y por la tarde, se aplicó otra dosis de 2 mL de FSH y se procedió a retirar el implante de progesterona. En el día 7 se inyectaron dos dosis de 1 mL de FSH, una por la mañana y otra por la tarde. En vaquillonas la dosis de FSH utilizada fue menor (280 mg). Las dosis fueron divididas en dos dosis (una matinal y una vespertina) de 3, 2, 1 y 1 mL cada una en los días 4, 5, 6 y 7, respectivamente. En el día 8 se realizó el control de celo de la donante para posteriormente realizar la IA.

3.4.2. *IA con semen sexado hembra*

A las 18 y 30 h después del comienzo del celo se realizaron las inseminaciones de cada donante (n=20). Se emplearon 7 vacas donantes para el toro H (pajuelas con 10 millones de espermatozoides), 4 hembras para el toro G y 3 hembras para cada toro M, N y O. Se inseminó con dos pajuelas de 3 millones de espermatozoides sexados o con una única pajuela de 10 millones, en forma intrauterina profunda, en cada horario de inseminación. En total se emplearon 4 pajuelas de 3 millones de espermatozoides sexados (12 millones de espermatozoides totales; toros L, M, N y O) o 2 pajuelas de 10 millones por vaca donante (20 millones de espermatozoides totales; toro H).

3.4.3. *Colecta de embriones*

En el día 15 del tratamiento se realizó la colección de embriones. En primer término se administró anestesia epidural con 2% de lidocaína. Unos minutos después, se vació el contenido del recto de la vaca donante, se palparon los ovarios para estimar la respuesta superovulatoria al tratamiento y se estimó el número de cuerpos lúteos presentes.

Posteriormente se enhebró uno de los cuernos uterinos con la sonda de lavaje y se fijó el balón de la sonda en el tercio medio del cuerno. Se conectó una tubuladura en forma de Y a un envase con el medio de lavaje (Nutricell, Brasil) a 1 metro de altura de la vaca y el filtro de colección en la parte inferior, protegido de la luz y del frío. Para el lavaje propiamente dicho, se permitió la entrada de líquido a través de la llave superior de la tubuladura, se llenó la porción del cuerno a lavar y finalmente se abrió la llave para la salida del líquido. Se empleó aproximadamente medio litro de medio por cada cuerno uterino. Finalmente se retiró la sonda, se enjuagó y se procedió a realizar el lavaje del otro cuerno. Una vez terminado el procedimiento se inyectaron 2 mL (500 µg) de prostaglandina i.m. (Cloprostenol, Cooper, Canadá). Se realizaron 7 colectas para el toro H, 4 para el toro L y 3 para cada toro M, N y O.

3.4.4. Análisis de la producción de embriones in vivo con semen sexado hembra

Se analizaron los embriones recuperados y se compararon los porcentajes de recuperación de embriones transferibles (mórulas y blastocistos) con respecto al número de oocitos y embriones totales obtenidos, de acuerdo a los tratamientos de SOV, IA y lavados de 23 vacas inseminadas a campo con pajuelas sexadas de 5 toros comerciales (H, L, M, N y O). Las pajuelas sexadas comerciales de los toros L, M, N y O contenían la cantidad estándar de espermatozoides (3 millones de espermatozoides sexados por pajueta). Las pajuelas del toro H contaban con 10 millones de espermatozoides cada una.

3.4.5. Colección y maduración de oocitos de matadero

Se realizó el procedimiento descrito en la sección 2.4.2.

3.4.6. Fecundación in vitro

La FIV fue realizada según se describe en la sección 2.4.6. La coincubación de las gametas se realizó en gotas de 50 µL. Se realizaron 3 repeticiones empleando el semen de los toros E, F, G y H y 2 repeticiones con los toros I y J.

3.4.7. Cultivo in vitro

El cultivo *in vitro* fue descrito en la sección 2.4.7.

3.4.8. *Análisis estadístico*

El desarrollo embrionario se analizó con el procedimiento descrito en la sección 2.4.10.

3.5. RESULTADOS

3.5.1. Recuperación de embriones *in vivo* producidos por SOV e IA con semen sexado hembra

En la Tabla 3 se consideraron repeticiones de SOV e IA con pajuelas sexadas con 3 millones de espermatozoides (toros L, M, N y O) y pajuelas del toro comercial H conteniendo 10 millones de espermatozoides sexados. Las dosis inseminantes fueron de 12 y 20 millones de espermatozoides sexados, respectivamente. Los resultados obtenidos muestran altas tasas de producción de embriones transferibles (mórulas y blastocistos) para los toros H, M y N (45/134, 34%; 15/34, 44%; y 8/22, 36%; respectivamente). Los resultados no variaron significativamente ($P>0,05$) entre los tratamientos, empleando distintas dosis inseminantes.

Tabla 3. Producción de embriones *in vivo* por SOV e IA con semen sexado hembra. Se muestran los resultados obtenidos usando semen sexado de 5 toros comerciales (H, L, M, N y O).

Toro	Nro. de colectas	Estructuras totales recuperadas (oocitos y embriones)	Embriones transferibles (mórulas y blastocistos) producidos (%)
H*	7	134	45 (34)
L	4	69	15 (22)
M	3	34	15 (44)
N	3	22	8 (36)
O	3	22	2 (9)
TOTAL	20	281	85 (30)

*Dosis inseminante de 20 millones de espermatozoides totales (frente a 12 millones para el resto de los toros evaluados). No hubo diferencias significativas ($P<0,05$) entre las dosis empleadas.

En la Figura 7, se analizó específicamente la variabilidad por toro. Esto es, las diferencias que hay en cada inseminación con el mismo semen sexado. Se obtuvieron rangos muy amplios de obtención de embriones transferibles para cada repetición individual. La media para cada toro no resultó representativa para cada ensayo realizado, dado el amplio intervalo entre los valores máximo y mínimo.

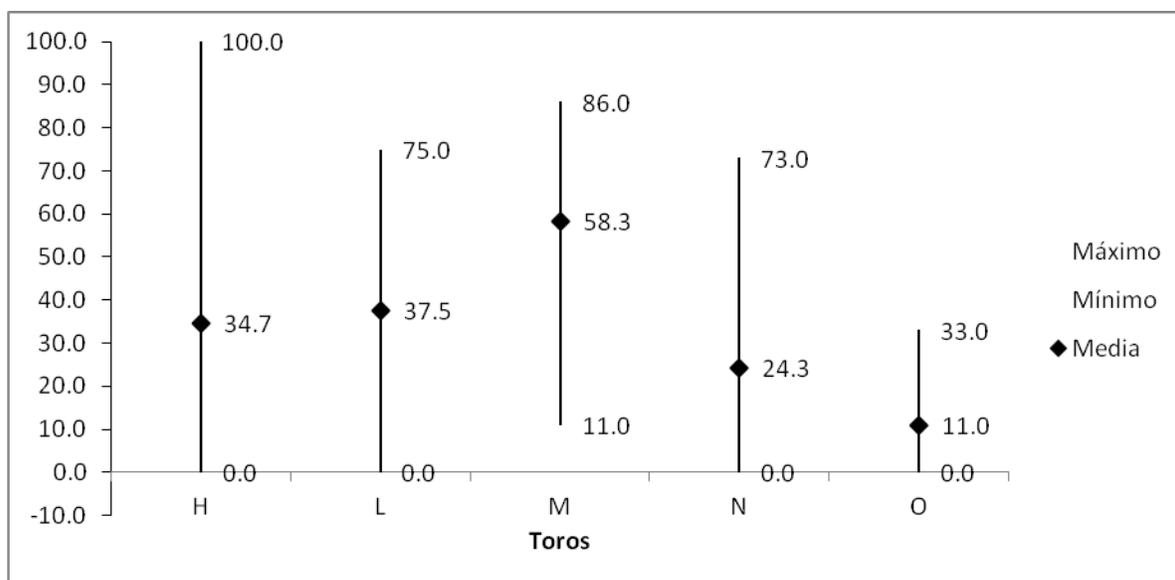


Figura 7. Variabilidad por toro en SOV e IA con semen sexado hembra. Variabilidad entre las repeticiones totales de cada toro (H, L, M, N y O) comparado. Se analizó el porcentaje de embriones transferibles obtenidos (mórulas o blastocistos), respecto de las estructuras (oocitos y embriones) totales recuperadas en lavados de distintas vacas superovuladas e inseminadas artificialmente con semen sexado hembra. Las pajuelas comerciales del toro H contenían 10 millones de espermatozoides sexados; mientras que las de los toros L, M, N y O fueron pajuelas de 2 a 3 millones de espermatozoides totales.

3.5.2. FIV con semen sexado hembra

En la Tabla 4 se muestran los resultados de embriones obtenidos *in vitro*, comparando partidas de semen convencional y sexado, nacional e importado (toros E, F y G, 3 repeticiones para cada uno). De algunas partidas (toros H, I y J) solo se contó con semen sexado y se realizaron 3 repeticiones para el toro H y 2 repeticiones para cada toro I y J. Es posible apreciar que no hubo diferencias significativas entre el semen de los toros E

(nacional) y F (importado), cuando se comparó el empleo del semen sexado hembra respecto de su contraparte convencional no sexada (35/216, 16% y 10/98, 10%, para el toro E convencional y sexado, respectivamente; 38/248, 15% y 19/148, 13%, para semen convencional y sexado del toro F, respectivamente). Sin embargo, las tasas de embriones del toro G fueron significativamente mayores a las de los toros E y F (71/142, 50% y 34/145, 23%, para el toro G convencional y sexado, respectivamente). El toro G también presentó diferencias significativas ($P < 0,05$) de acuerdo a las partidas sexadas o no sexadas, pero de todas maneras los porcentajes de blastocistos obtenidos siempre fueron significativamente mayores ($P < 0,05$) que los toros E y F. En la Figura 9 se muestran blastocistos de diferentes calidades obtenidos por FIV con semen sexado del toro G. La variabilidad de los resultados es alta, siendo las partidas de semen sexado importado, correspondientes a los toros G e I, las que permitieron obtener tasas significativamente más altas ($P < 0,05$) de producción de embriones *in vitro* (34/145, 23% y 22/61, 36%, respectivamente). Sin embargo, la variabilidad en el análisis de los porcentajes de embriones obtenidos empleando toros individuales fue muy baja (Figura 8).

Tabla 4. Producción de embriones *in vitro* por FIV con semen sexado hembra. Se muestran los resultados obtenidos usando semen sexado de 6 toros comerciales. Las pajuelas del toro H contenían 10 millones de espermatozoides; mientras que las de los toros E, F, G, I y J fueron pajuelas de 2 a 3 millones de espermatozoides totales. De los toros H, I y J solo se comparó la producción de embriones *in vitro* con semen sexado hembra.

Origen	Toro	Tipo de semen	n	Clivaje (%)	Nro. blastocistos (%)	Blastocistos/clivados (%)
Nacional	E	Convencional	216	150 (69)abh	35 (16)abh	35/150 (23)ab
		Sexado	98	54 (55)abi	10 (10)abi	10/54 (18)ab
	H*	Sexado	215	27 (13)ac	2 (1)ac	2/27 (7)ac
Importado	F	Convencional	248	144 (58)bdh	38 (15)bdh	38/144 (26)bd
		Sexado	148	117 (79)bdi	19 (13)bdi	19/117 (16)bd
	G	Convencional	142	111 (78)beh	71 (50)beh	71/111 (64)be
		Sexado	145	59 (41)bei	34 (23)bei	34/59 (58)be
	I	Sexado	61	49 (80)bf	22 (36)bf	22/49 (45)bf
	J	Sexado	91	44 (48)bg	6 (7)bg	6/44 (14)bg

*Pajuelas sexadas con 10 millones de espermatozoides (frente a 2 a 3 millones para el resto de los toros evaluados)
n: número de oocitos sujetos a MIV. (a,b,c,d,e,f,g,h): Valores con distintas letras difieren significativamente (P<0,05).

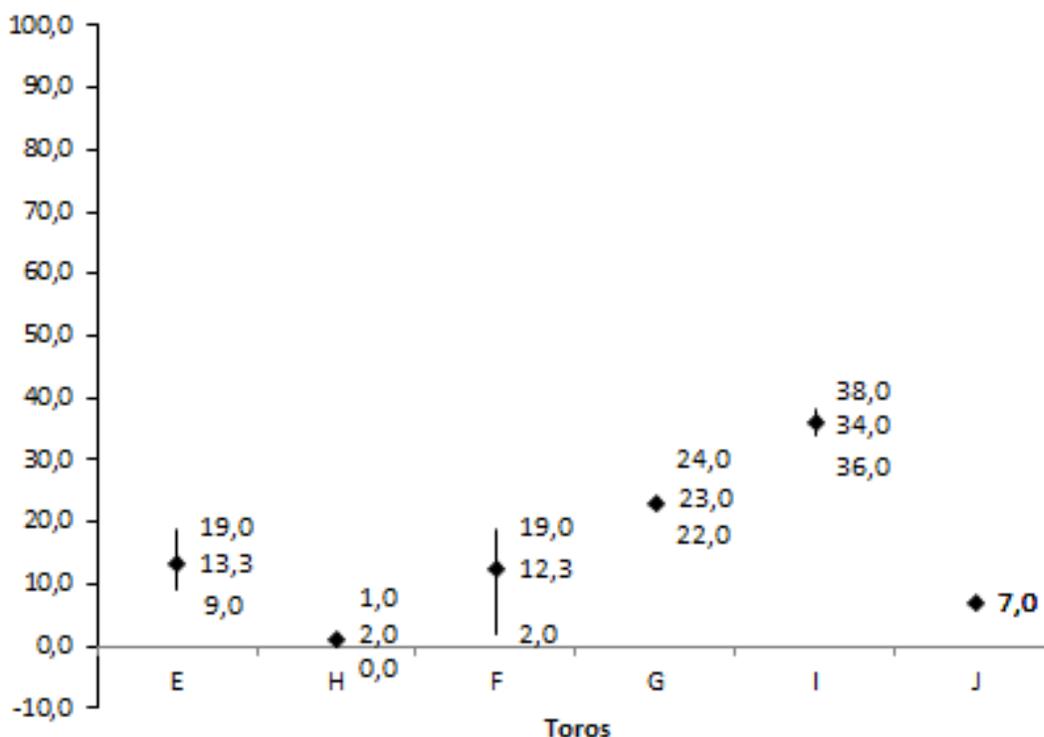


Figura 8. Variabilidad por toro en FIV con semen sexado hembra. Variabilidad entre las repeticiones totales de cada toro (E, H, F, G, I y J) comparado. Se analizó el porcentaje de blastocistos producidos respecto del número de oocitos totales sujetos a FIV con semen sexado. Las pajuelas comerciales del toro H contenían 10 millones de espermatozoides sexados; mientras que las de los toros E, F, G, I y J fueron pajuelas de 2 a 3 millones de espermatozoides totales.

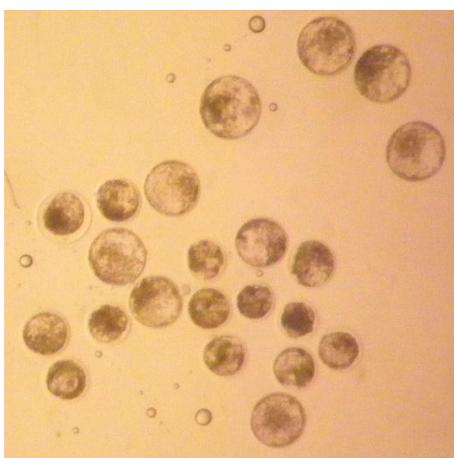


Figura 9. Diferentes calidades de blastocistos obtenidos por FIV con semen sexado hembra del toro G. Las mayores tasas de clivaje y producción de blastocistos por FIV fueron obtenidas empleando el semen sexado del toro comercial importado G.

3.6. DISCUSIÓN

La FIV con semen sexado es una técnica que permite obtener tasas de producción de embriones *in vitro* semejantes a las obtenidas empleando semen convencional. Por lo tanto, además de fines comerciales, la FIV con semen sexado puede tener una aplicación directa en la generación de embriones quiméricos. De esta forma, la agregación de embriones de diferente sexo sería una herramienta de marcado que permita reconocer el origen y la contribución de cada célula o embrión en el agregado final.

El uso de semen sexado en el protocolo de SOV e IA implementado permitió la producción de embriones *in vivo* con tasas aceptables de desarrollo embrionario cuando se emplearon los toros H, M y N, sin existir diferencias significativas entre las dosis inseminantes empleadas dependientes de la concentración de espermatozoides por pajuela (Tabla 3). Sin embargo, la producción de embriones *in vivo* con el mismo semen sexado demostró ser altamente variable (Figura 7), imposibilitando la repetitividad de los resultados. Por este motivo, el empleo de semen sexado a campo aún no tiene gran aceptación en nuestro país. Factores externos podrían estar influyendo en estos resultados *in vivo*, como por ejemplo el manejo particular que realiza cada establecimiento en el que se realizaron los ensayos. Sin embargo, aún no se han establecido estándares de manejo a nivel nacional que garanticen buenos resultados y, por lo tanto, el uso de semen sexado a campo aumenta los costos tanto en el uso de pajuelas sexadas como en los protocolos de estimulación de vacas donantes de oocitos para la SOV. En el mismo sentido, el estado del útero, tanto de la hembra donante como de la receptora, debería ser analizado para descartar aquellos animales con cierto grado de endometritis y, por lo tanto, mejorar la eficiencia de la técnica (Madoz y col., 2014).

Respecto del uso de semen sexado, tanto nacional como importado, fue posible determinar que, seleccionando el toro, no existen diferencias significativas en las tasas de blastocistos sobre clivados, respecto del semen convencional sin sexar. Estos resultados coinciden con otros reportes publicados anteriormente (Xu y col., 2006; Rasmussen y col., 2013). La causa de que las diferencias se presenten a nivel de clivaje y producción de

blastocistos reside en la concentración de espermatozoides viables empleados respecto de la cantidad de oocitos colocados en la gota de FIV. En nuestras condiciones, para lograr una concentración de espermatozoides sexados semejante a la de semen convencional deberían emplearse una cantidad mayor de pajuelas sexadas, lo que representaría altos costos. En el mismo sentido, dado que en trabajos *in vitro* con oocitos provenientes de ovarios de matadero es posible disponer de un mayor número de estructuras comparado con aquellos obtenidos por aspiración folicular, este efecto no sería representativo a nivel comercial.

La comparación conjunta de todos los toros nacionales frente a los importados, demostró una diferencia significativa en torno del origen del semen. Los toros importados produjeron tasas mayores de embriones ($P < 0,05$) respecto de los nacionales. Los toros G e I (sexados importados) presentaron tasas de producción de embriones *in vitro* con semen sexado hembra mayores que los demás machos evaluados. El toro G resultó en tasas superiores de blastocistos respecto de los toros E (nacional) y F (importado), tanto cuando se lo empleó sexado como convencional sin sexar (Tabla 4). Por lo tanto, fue posible confirmar que existe gran variabilidad en las tasas de clivaje y de blastocistos entre distintos machos, dependiendo de su origen. Estudios anteriores han permitido establecer que el hecho de que un toro tenga bajos porcentajes de producción de embriones *in vitro* significa, en la mayoría de los casos, una falla en la capacitación de los espermatozoides (proceso que se lleva a cabo en el ambiente uterino tras IA o un servicio natural; Rodríguez-Martínez, 2007a) (Lu y Seidel, 2004; Xu y col., 2009). Por lo tanto, la generación de un perfil individual de cada toro a través de pruebas con concentraciones crecientes de heparina (agente capacitante en FIV) permitiría mejorar los bajos porcentajes. Nuevamente, tanto para IA como para FIV fue posible apreciar un efecto macho que perjudica los resultados obtenidos, tal como se discutió en el Capítulo II.

Si bien los porcentajes globales de producción de embriones empleando semen sexado por SOV e IA frente a FIV no variaron (30% frente a 27%, respectivamente); el uso del semen sexado en protocolos de IA presenta alta variabilidad (Figura 7), mientras que la producción de embriones *in vitro* lograría estabilizar los resultados, estandarizando el empleo (Figura 8).

Lamentablemente, no es posible acceder a datos oficiales de las condiciones de sexado ni de las características del semen que sufrió ese proceso. Por lo tanto, a las variables discutidas en el Capítulo II respecto de las partidas de semen (Orgal y col., 2012) y los procedimientos de criopreservación (Meyers, 2005; Bläse y col., 2012; Taşdemir y col., 2013), debe adicionarse la variable de sexado. Contar con los parámetros de sexado podría permitir establecer alguna diferencia particular que dependería únicamente del proceso de separación y clasificación de los espermatozoides (Mocé y col., 2006; Barceló-Fimbres y col., 2011). Al tratarse de partidas comerciales se supone que los espermatozoides pasaron por estándares preestablecidos, pero que pueden ser diferentes entre las empresas que lo comercializan. Los diferentes grados de daños en el semen debido al proceso de sexado también perjudican la estandarización de una concentración espermática para el desarrollo de FIV. En nuestras condiciones, no se seleccionaron espermatozoides vivos y muertos, sino que se ajusta a una concentración final (Brackett y col., 1982). Por lo tanto, las menores tasas de clivaje observadas en los toros sexados (que no afectaron la producción de blastocistos) podrían ser atribuidas a una mayor proporción de espermatozoides no viables en las pajuelas empleadas. Al mismo tiempo, otra limitación respecto del uso del semen sexado es la disponibilidad. Las partidas comerciales importadas de semen sexado que ingresan a nuestro país no cuentan con una continuidad en el tiempo que permita disponer libremente a su empleo. Este hecho dificulta la realización de diseños experimentales establecidos y encarece los procesos.

Por todo lo expuesto, la FIV estaría brindando alternativas para la resolución del problema de la baja producción de embriones a partir de semen sexado, mientras que en IA las opciones son más acotadas; estableciéndose simultáneamente como una alternativa para el mercado celular.

CAPÍTULO IV.

VITRIFICACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS LIBRES DE ZONA PELÚCIDA

- Los resultados de vitrificación de este trabajo fueron presentados durante el X Simposio Internacional de Reproducción Animal del Instituto de Reproducción Animal de Córdoba (IRAC), llevado a cabo del 4 al 6 de julio de 2013 en la ciudad de Córdoba, Argentina, en formato de póster. **Hiriart MI**, Buemo CP, Suvá M, Canel NG, Salamone DF. Exitosa criopreservación de embriones bovinos con y sin zona pelúcida producidos por FIV sexada y convencional.

4.1. RESUMEN

La vitrificación es una técnica de criopreservación que consiste en evitar la formación de cristales de agua intracelulares, generando un estado sólido amorfo, sin estructura cristalina u organizada, en el interior celular. Actualmente, las tasas de desarrollo de embriones LZP son similares a las de embriones convencionales con ZP. Sin embargo, pocos trabajos han definido las mejores condiciones de criopreservación de estos embriones. Por lo tanto, en el presente capítulo, se evaluaron las tasas de reexpansión *in vitro* de blastocistos LZP producidos por FIV (FIV-LZP) que fueron vitrificados, calentados y recultivados. El control consistió en blastocistos de FIV con ZP (FIV-ZP). Los porcentajes de viabilidad a las 48 h no variaron significativamente para ambos grupos (20/32, 62% para el grupo FIV-ZP y 10/19, 53% para los embriones FIV-LZP). Esto demuestra que es posible vitrificar satisfactoriamente blastocistos expandidos LZP mediante el empleo de una adaptación del método del *CryoTip*®.

4.2. INTRODUCCIÓN

La vitrificación es el método de elección para criopreservar embriones de PIV, dados los bajos resultados obtenidos tras los tratamientos de congelamiento convencional implementados para este tipo de embriones (Dinneyés y Nedambale, 2009; Nicacio y col., 2011). La vitrificación consiste en evitar la formación de cristales en el interior de las células (Yu y col., 2010), generando intracelularmente un estado sólido amorfo, sin estructura cristalina u organizada, semejante al vidrio. Esto se logra mediante la combinación de tres factores: tasas de enfriamiento ultrarrápidas, alta viscosidad y mínimo volumen del medio de vitrificación (Saragusty y Arav, 2011).

Existen diversas diferencias metabólicas y morfológicas entre los embriones producidos *in vitro* (PIV) e *in vivo* (TE). Los embriones de PIV cuentan con citoplasmas más oscuros, menor compactación de blastómeras, anomalías metabólicas, diferente patrón de expresión génica, mayor contenido lipídico, entre otras características diferenciales (Fair y col., 2001; Abe y col., 2002; Rizos y col., 2002; Concoran y col., 2006), que se suponen las causas de su menor criotolerancia. El gran auge de la PIV está poniendo de manifiesto la necesidad de estandarizar protocolos eficientes de conservación de este tipo de embriones, tanto para independizarse de la disponibilidad de receptoras, como para la comercialización de dichos embriones.

Las alternativas para valorar la calidad y viabilidad de los embriones criopreservados incluyen: porcentaje de re-expansión en cultivo, porcentaje de extrusión de la ZP, porcentaje de preñez, porcentaje de terneros nacidos, viabilidad del MCI, marcadores metabólicos (uso de glucosa, producción de lactato), producción de IFN-Tau, evaluación de blastómeras apoptóticas, entre otros. De cualquier forma, aún está en debate si estas características del cultivo *in vitro* tienen una relación directa con la TE. Asimismo, el estadio embrionario en el momento de la vitrificación tiene fundamental importancia sobre la posterior sobrevivencia (Trounson y col., 1976).

Las publicaciones respecto de embriones vitrificados no presentan grandes diferencias respecto de los resultados obtenidos por diferentes técnicas. La metodología de criopreservación generalmente es mantenida, mientras que los trabajos de distintos autores varían en el sistema empleado, la cantidad y el tipo de crioprotector, el tiempo y la temperatura del protocolo y la adición o no de aditivos, como azúcares o surfactantes (Vajta y col., 1999). Actualmente, los trabajos han comenzado a centralizarse en un abordaje embrionario, con el objetivo de generar embriones más resistentes a la criopreservación (Seidel, 2006; Sudano y col., 2012). La vitrificación no ha sido ampliamente empleada en protocolos de SOV, IA y TE debido a que resulta un proceso delicado y en varias etapas que resulta inviable para las condiciones de campo (van Wagtendonk-de Leeuw y col., 1997; Vajta, 2000). En este sentido, varios intentos de generar un sistema de calentamiento en un solo paso han sido establecidos (Vajta y col., 1999; Inaba y col., 2011; Rodríguez-Villamil y col., 2013). Sin embargo, hay pocos resultados de TE de dichos embriones criopreservados que sustenten de manera fehaciente las pruebas realizadas en el laboratorio.

La criopreservación de embriones generados por clonación embrionaria se impone como un nuevo desafío. Asimismo, el desarrollo de las técnicas ha permitido la producción de embriones LZP, por ejemplo a través de clonación manual o HMC (del inglés *Hand Made Cloning*) (Vajta y col., 2000; Tagawa y col., 2008; Gambini y col., 2012; Hiriart y col., 2013). Sin embargo, pocos trabajos han definido las mejores condiciones de criopreservación de estos embriones (Tecirlioglu y col., 2003). Uno de los objetivos de los procesos de congelamiento tradicional y vitrificación convencionales es evitar fracturas de la ZP. Sin embargo, no ha sido establecido el fundamento de la integridad de la ZP (Rall y Meyer, 1989; Kasai y col., 1996), que no se correspondería en el caso de los embriones LZP.

Dado que las siguientes experiencias planteadas en esta Tesis incluyen la generación de embriones LZP y que la información bibliográfica en este sentido es muy limitada, es que se planteó la hipótesis respecto de la posibilidad de preservar la sobrevivencia de este tipo de embriones después de un procedimiento de vitrificación.

4.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

4.3.1. Experimento 1. Vitricación de embriones LZP

Blastocistos LZP producidos por FIV fueron vitrificados, calentados y recultivados. Se evaluó la reexpansión *in vitro* de estos embriones a las 3 y 48 h post-calentamiento. El control consistió en blastocistos de FIV con ZP.

4.4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1. *Colección y maduración de oocitos de matadero*

Las condiciones de MIV fueron descritas en la sección 2.4.2.

4.4.2. *Fecundación in vitro*

Las condiciones de FIV fueron descritas en la sección 2.4.6.

4.4.3. *Remoción de las células del cúmulus y la ZP*

Tras la FIV, los presuntos cigotos fueron sometidos a agitación mecánica durante 3 min en medio TALP-H para eliminar las células del cúmulus; luego se lavaron tres veces en medio TALP-H y se sometieron a tratamiento con solución de pronasa (P8811) durante pocos minutos para remover la ZP. Finalmente, los embriones se enjuagaron en medio TALP-H suplementado con 10% de SFB para inhibir el efecto de la enzima.

4.4.4. *Cultivo in vitro*

El cultivo de los embriones con ZP fue descrito en la sección 2.4.7. Los embriones LZP fueron cultivados en medio SOF suplementado con 2,5% v/v de SFB en un sistema similar al WOW (Vajta y col., 2000), donde los micropozos se produjeron usando un capilar de vidrio de punta redondeada, calentada ligeramente y colocada en la parte inferior de una placa de Petri. Los grupos de micropozos se cubrieron con una gota 100 μ L de medio SOF (20 a 30 micropozos en cada gota). El 50% del medio de cultivo fue renovado en el día 2 y se suplementó con 10% de SFB en el día 5. No se evaluaron tasas de clivaje en el día 2 ni de producción de blastocistos en el día 7.

4.4.5. *Vitrificación de embriones con ZP y LZP*

Se siguió el protocolo de vitrificación descrito por Gibbons y col. (2011). Brevemente, el proceso de vitrificación consistió en transferir los blastocistos obtenidos en grupos de 2 o 3 embriones a tres soluciones distintas a temperatura ambiente: (1) 10% de glicerol en HS (medio TALP-H suplementado con 20% de SFB) durante 5 min; (2) 20% de EG en Solución 1 durante 5 min y (3) 25% de G y 25% de EG en HS durante 30 seg.

Luego, 1, 2 o 3 embriones fueron cargados en 0,5 a 1 μL de Solución 3 (solución vitrificante), en el interior de un tip plástico e inmediatamente depositados en un criotubo con nitrógeno líquido, identificados y conservados en un tanque con nitrógeno líquido hasta su calentamiento y recultivo.

4.4.6. *Calentamiento de embriones con ZP y LZP*

El proceso de calentamiento consistió en sujetar el tip de 10 μL durante 6 a 10 seg con los dedos. Luego, los embriones fueron transferidos a cuatro soluciones diferentes a temperatura ambiente durante 5 min en cada una para permitir la remoción de los crioprotectores intracelulares: (1) 12,5% de G, 12,5% de EG y 1 M de sucrosa en HS; (2) 1M de sucrosa en HS; (3) 0,5 M de sucrosa en HS; y (4) solo HS. Los embriones fueron colocados en gotas de medio SOF para la evaluación de su reexpansión *in vitro*.

4.4.7. *Cultivo embrionario y evaluación de la reexpansión post-calentamiento*

La evaluación de la reexpansión de los embriones vitrificados y calentados fue realizada en gotas de 100 μL de medio SOF. Se evaluaron tasas de reexpansión a las 3 y 48 h para los grupos con ZP y LZP.

4.4.8. *Análisis estadístico*

Se realizó el procedimiento descrito en la sección 2.4.10.

4.5. RESULTADOS

4.5.1. *Vitrificación de embriones LZP*

En la Tabla 5 se exponen los resultados de viabilidad de embriones vitrificados con ZP y LZP. No se observan diferencias significativas entre las tasas de reexpansión a las 3 y 48 h entre los embriones vitrificados con ZP y LZP. Algunos embriones LZP perdieron células durante su reexpansión (Figura 10), cuyo número no fue determinado. Dicho efecto no fue observado en los embriones con ZP (Figura 11).

Tabla 5. Reexpansión de blastocistos bovinos generados por FIV vitrificados con ZP y LZP. Se evaluaron las tasas de reexpansión a las 3 y 48 h de blastocistos día 7 generados por FIV y cultivados con ZP y LZP (grupos FIV-ZP y FIV-LZP, respectivamente), vitrificados y calentados.

Técnica	Nro. de blastocistos vitrificados	Nro. embriones reexpandidos a las 3h (%*)	Nro. embriones reexpandidos a las 48h (%*)
FIV-ZP	32	13 (41)	20 (62)
FIV-LZP	19	8 (42)	10 (53)

*Porcentajes determinados respecto del número inicial de embriones vitrificados y calentados (n).
No hubo diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las técnicas empleadas.

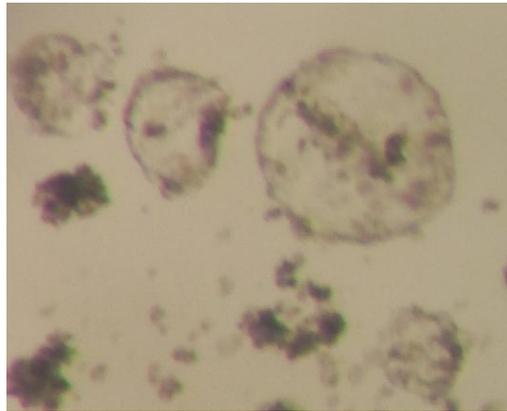


Figura 10. Blastocistos obtenidos de embriones LZP vitrificados. Blastocistos reexpandidos producidos por FIV y cultivados LZP, vitrificados y calentados. Fotografía tomada a las 48 h post-calentamiento.

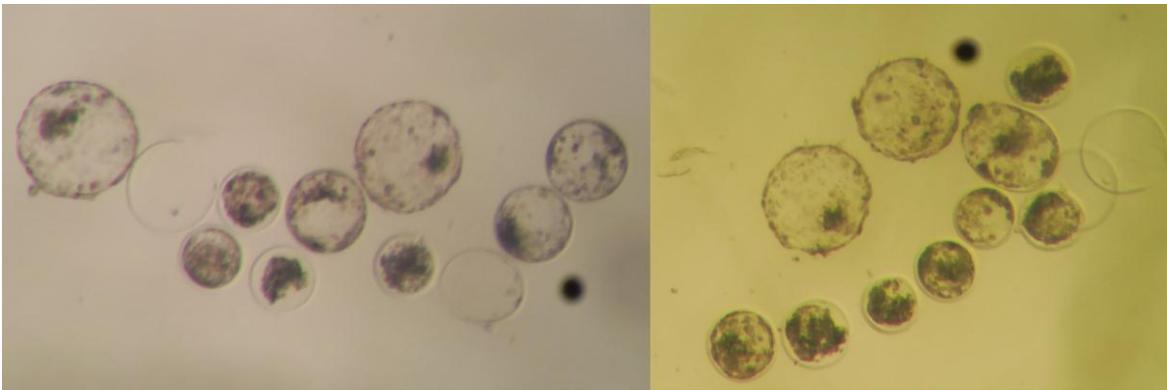


Figura 11. Blastocistos obtenidos de embriones con ZP vitrificados. Blastocistos expandidos y eclosionados producidos por FIV y cultivados con ZP, vitrificados y calentados. Fotografía tomada a las 48 h post-calentamiento.

4.6. DISCUSIÓN

Criopreservar exitosamente embriones representa un desafío para la conservación de los mismos, tanto en lo referente al manejo de hembras receptoras, a la comercialización e incluso a condiciones subóptimas de trabajo. En nuestro laboratorio, se producen diariamente embriones LZP, ya sea por clonación o por FIV (Gambini y col., 2012; Hiriart y col., 2013). Existen pocos reportes de criopreservación de este tipo de embriones, por lo que resulta innovador el análisis de su sobrevivencia.

En nuestros resultados preliminares de vitrificación es posible observar altas tasas de viabilidad a las 48 h de embriones vitrificados producidos por FIV y cultivados LZP, que no variaron significativamente con aquellos embriones control con ZP. Por lo tanto, la vitrificación mediante una adaptación del método del *CryoTip*[®] (Kuwayama y col., 2005), reportado inicialmente en ovinos y caprinos (Gibbons y col., 2011), ha demostrado ser eficiente también para su aplicación en embriones de FIV bovinos, con ZP y LZP. El estadio del desarrollo en el cual el embrión es criopreservado también influye en los resultados obtenidos. En este caso, tal como fue sugerido previamente (Han y col., 1994; Hasler y col., 1995), fueron vitrificados blastocistos expandidos.

Durante el período de reexpansión post-calentamiento, los embriones LZP perdieron algunas de sus células (Figura 10). No fue posible determinar el efecto de este fenómeno en nuestras condiciones, por lo que son necesarios más estudios, como la determinación del número de células pre y post-vitrificación, análisis transcripcionales de factores relacionados al estrés y la apoptosis y TE a hembras receptoras. Recientemente ha sido reportada la criopreservación exitosa de clones de búfalo LZP generados por HMC, utilizando el método OPS (Sirisha y col., 2013). Sin embargo, aún no han sido publicados datos de transferencia de estos embriones en hembras receptoras. Si bien existen varias opciones para analizar la viabilidad embrionaria post-criopreservación, como tasas de reexpansión *in vitro* o incidencia de apoptosis, entre otros; el resultado concluyente reside en el nacimiento de las crías. En este sentido, Tecirlioglu y col. (2003) lograron, con baja eficiencia, el nacimiento de una cría bovina producida por HMC y vitrificada (Tecirlioglu y

col., 2003). Estos trabajos, junto con nuestros resultados, representan puntos de partida interesantes para profundizar en el estudio de la criopreservación de embriones LZP, como también en la incidencia de la ZP en protocolos de vitrificación y calentamiento.

Conjuntamente, el debate actual respecto de la criopreservación de embriones de PIV se centra en el desarrollo de medios de cultivo que permitan la generación de embriones *in vitro* con características más similares a los producidos *in vivo* y, por lo tanto, con mayor resistencia a la criopreservación (Seidel, 2006; Sudano y col., 2012). Por todo lo expuesto, las perspectivas futuras en torno de la criopreservación de embriones resultan alentadoras.

CAPÍTULO V.

TRANSFERENCIA DE OOPLASTOS A PRESUNTOS CIGOTOS BOVINOS DE FIV-LZP

- Los resultados parciales de este trabajo fueron presentados en la XXVII Reunión Anual de la Sociedad Brasileira de Tecnologías de Embriones (SBTE), realizada en Praia do Forte (Bahía, Brasil), del 29 de agosto al 1 de setiembre de 2013, en formato de póster. **Hiriart MI**, Canel NG, Gambini A, Bevacqua RJ, Camargo A LS, Salamone DF (2013). *Ooplasmic transfer on the development of zona-free IVF bovine embryos*. Acta Scientiae Veterinariae (suplemento). Resumen.
- Los datos de desarrollo de blastómeras individuales de embriones de fecundación *in vitro* libres de zona pelúcida forman parte del trabajo “Sistema de producción, multiplicación y conservación de embriones bovinos generados por fertilización *in vitro* con semen sexado hembra”, premiado como **Mención de honor: BARBERIS Y CAVALLERO S.A.** Rubro: Tecnología aplicada a la producción de carne y leche. Manejo (Categoría: Empresas) por el Centro Internacional de Innovación en Tecnología Agropecuaria (CiTA), en Capital Federal en julio de 2013.

5.1. RESUMEN

El término ooplasto se refiere al oocito enucleado, que consiste en un citoplasma (ooplasma) rodeado de una membrana plasmática (oolema), carente de núcleo. Son muy pocos los reportes respecto de la transferencia de ooplastos (TO). Con el objetivo de multiplicar embriones, la hipótesis de este trabajo radicó en la producción de embriones de mayor tamaño por TO de uno (grupo 1+) y dos (grupo 2+) ooplastos a presuntos cigotos de FIV, generando también blastómeras que puedan ser más competentes y que sustenten su desarrollo individual en estadios embrionarios tempranos. Contrariamente a lo esperado, la TO produjo aceleración de la cinética de desarrollo, produciendo embriones con mayor número de células en el día 2. Sin embargo, la producción de embriones disminuyó en forma significativa ($P < 0,05$) respecto de los grupos control FIV-LZP y FIV-LZPF (sometido al mismo pulso de fusión que los grupos experimentales). Las posibles causas de esta disminución radicarían en una disminución de la relación superficie/volumen que afectaría el intercambio de nutrientes o bien en la combinación aleatoria de ooplastos y presuntos cigotos incompatibles. Sin embargo, fue posible multiplicar exitosamente embriones de FIV cultivados LZP en estadio de 2 y 4 células.

5.2. INTRODUCCIÓN

Se denomina ooplasto a la combinación del citoplasma del oocito enucleado (ooplasma) y la membrana plasmática que lo rodea (oolema). La transferencia de ooplasmas ha sido empleada principalmente en humanos para mejorar el desarrollo de oocitos comprometidos (Cohen y col., 1998; Barrit y col., 2001a); mientras que en animales domésticos se ha centrado en el estudio de herencia mitocondrial de embriones de transferencia nuclear de célula somática (TNCS) por clonación manual o HMC (del inglés, *Hand Made Cloning*) (De Souza y col., 2009; Mezzalira y col., 2011). Existen tres formas básicas de realizar transferencias de ooplasmas: inyección, fusión y agregación. La inyección de cantidades de ooplasmas en oocitos en MII (Cohen y col., 1998) ha permitido obtener tasas de fertilización significativamente menores que la fusión; mientras que la agregación ha sido aplicada en clones producidos HMC. Son muy pocos los reportes respecto de la transferencia de ooplastos (TO). Sin embargo, en humanos, se han logrado nacimientos tras TO en presuntos cigotos (Cohen y col., 1997; Huang y col., 1999).

El oocito es el encargado de sustentar las primeras etapas del desarrollo embrionario, antes de que comience la AGE y, con ello, la independencia del embrión (Battaglia y col., 1996; Sirard y col., 2006). En ese punto, las mitocondrias cumplen un papel fundamental, ya que constituyen la mayoría de las organelas celulares (aproximadamente 23% en el embrión humano preimplantatorio) (Murakoshi y col., 2013). El ADN mitocondrial (ADNmt) es un genoma circular de 16,6 kilobases localizado en las mitocondrias de las células eucariotas (Anderson y col., 1981), que codifica para componentes de la cadena de transporte de electrones necesarios para la generación de energía en forma de ATP, a través de la fosforilación oxidativa (Attardi y col., 2006). Después de la fecundación, el ADNmt del cigoto es materno en su totalidad (Birky, 1995), ya que el ADNmt espermático es eliminado por un proceso de ubiquitinación (Sutovsky y col., 1999). Por lo tanto el embrión se encuentra en un estado de homoplasmia porque todas las copias derivan exclusivamente de la madre (Bitner-Glindzicz, 2002). Varios autores sugieren que una menor cantidad de ADNmt se relaciona con fallas en la fecundación (Reynier y col., 2001; May-Panloup y col., 2005). Además, en el bovino, el aumento en el

número de mitocondrias se relaciona con el volumen citoplasmático, lo que implicaría la necesidad de una correcta generación de energía para soportar el correcto desarrollo del embrión (Smith y Alcivar, 1993). Sin embargo, Chiaratti y col. (2010) demostraron que oocitos bovinos desprovistos del 90% de sus mitocondrias mantienen la capacidad de ser fecundados y alcanzan el estadio de blastocisto en tasas semejantes a los oocitos control (Chiaratti y col., 2010a). Esto sugiere que aquellos oocitos problema, probablemente cuenten con fallas en la maquinaria de replicación de ADNmt más que una disfunción en el material genético *per se*. Por otro lado, en el proceso tradicional de TNSC, un ooplasma es reconstruido con una célula somática, generando una condición de heteroplasma mitocondrial, donde las mitocondrias provenientes de la célula donante de núcleo también persisten en diferentes niveles del desarrollo embrionario (St John y col., 2004), aunque la mayor parte de las estructuras continúan derivando del oocito (Campbell y Alberio, 2003). Sin embargo, el HMC exagera las posibilidades de transmisión mitocondrial, al combinar los citoplasmas de diferentes oocitos (Vajta y col., 2001). Debido a que el ooplasma contiene factores esenciales para el desarrollo embrionario durante las primeras divisiones celulares, incluyendo factores de reprogramación que permiten el desarrollo de la TNCS, y que la función mitocondrial depende de la interacción de dos genomas (el ADN nuclear y el ADNmt), se ha adjudicado el bajo éxito de la TNCS interespecífica a incompatibilidades mitocondriales. Sin embargo, si bien la heteroplasma se mantiene en las etapas de desarrollo embrionario *in vitro*, en la mayoría de los casos desaparece en la descendencia (Chiaratti y col., 2010b). Asimismo, cierta diversidad de alelos mitocondriales es necesaria para lograr un grado de divergencia genética que promueva la transcripción y replicación correcta del ADNmt (Chiaratti y col., 2010b). Aún así, se especula que un aumento en la distancia evolutiva resulta en efectos nocivos para el desarrollo y la implantación embrionaria en procedimientos de clonación interespecífica (Amarnath y col, 2011; Lagutina y col., 2013).

Por otra parte, el análisis morfológico no es suficiente para seleccionar los mejores embriones de FIV (Farin y col., 1995). Recientemente, se ha sugerido la cinética del desarrollo como uno de los criterios no invasivos relacionados a la calidad embrionaria. Ha sido observado que embriones que clivan más lentamente tienen menores chances de

implantación que los que se dividen más rápidamente, aunque los motivos aún se desconocen (Fenwick y col., 2002; Edwards, 2003). Asimismo, el análisis de la expresión génica de genes específicos se ha aceptado como parámetros de calidad embrionaria (El-Sayed y col., 2006).

Asimismo, como se comentó en la sección 1.2.3., la separación de blastómeras por pipeteo permite obtener blastómeras individuales con mínimos daños celulares (Willadsen y col., 1979; Tagawa y col., 2008; Hiriart y col., 2013). Se han obtenido mellizos, trillizos (Willadsen y Polge, 1981) y cuatrillizos (Johnson y col., 1995), colocando las blastómeras individuales en ZP vacías. Sin embargo, esto representa un proceso engorroso que requiere de alto entrenamiento y capacitación. El sistema WOW (Vajta y col., 2000) ha permitido facilitar el sistema de cultivo de blastómeras individuales y, en este sentido, Tagawa y col. (2008) han obtenido buenas tasas producción de mellizos idénticos tanto tras el cultivo individual de blastómeras de embriones en estadio de 2 células, como de grupos de 4 blastómeras de embriones en estadio de 8 células (Tagawa y col., 2008).

En la base de que el número total de células de un embrión se ve limitado por el volumen citoplasmático y que el mismo no aumenta durante las primeras divisiones celulares, planteamos la hipótesis de producir embriones de mayor tamaño por fusión de ooplastos (TO). La hipótesis radica en producir embriones reconstruidos con blastómeras que puedan ser más competentes y que sustenten su desarrollo individual en estadios embrionarios tempranos.

5.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.3.1. Experimento 1. Producción de embriones reconstruidos por TO de uno (1+) o dos (2+) ooplastos en presuntos cigotos de FIV

Se retiró la ZP de presuntos cigotos de FIV (día 0) y se les fusionó uno (grupo 1+) o 2 (grupo 2+) ooplastos producidos por enucleación libre de zona pelúcida (LZP). Los embriones reconstruidos fueron cultivados en el sistema WOW. Se evaluaron las tasas de clivaje y el número de células en el día 2, y las tasas de blastocistos y el número de células en el día 7. Como controles se emplearon embriones de FIV LZP sujetos al pulso de fusión (FIV-LZPF) y no sujetos (FIV-LZP) (Figura 12). Asimismo, se determinó el tamaño de los embriones producidos y se relacionó la producción de blastocistos con el estadio celular en el día 2.

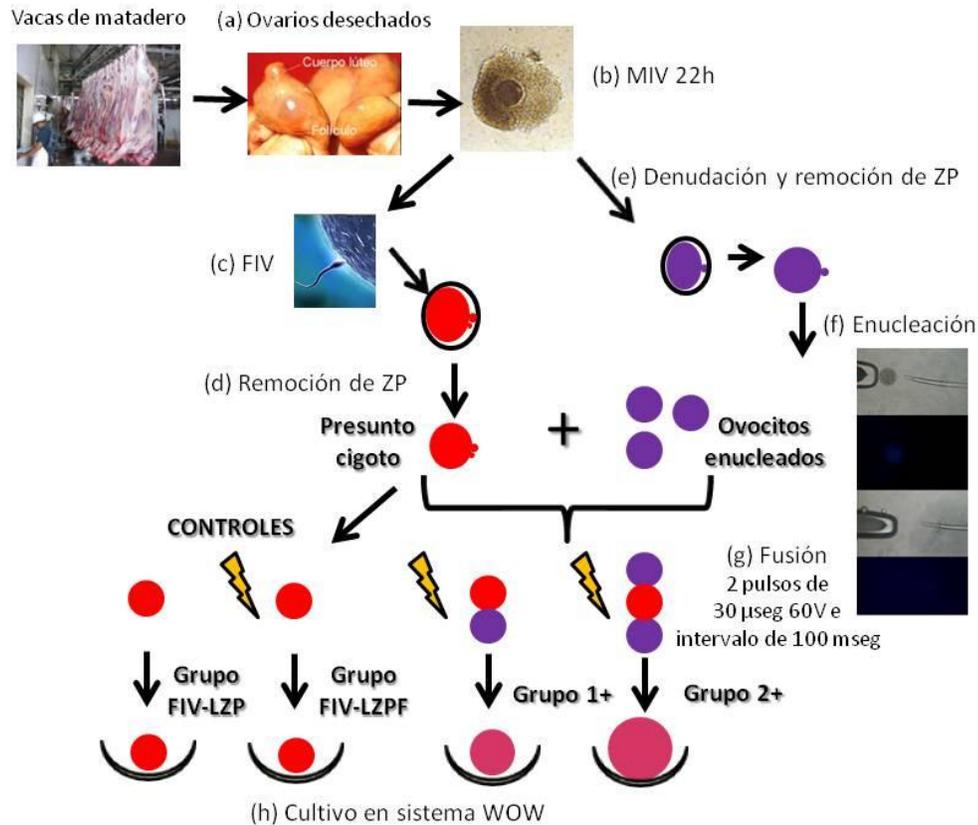


Figura 12. Diseño experimental para la producción de embriones por TO. (a) Ovarios provenientes de mataderos fueron sujetos a aspiración de folículos. (b) Los COCs fueron madurados *in vitro* durante 22 h en condiciones estándar. (c) Se realizó FIV en un grupo de oocitos maduros. (d) Después de 5 h de coincubación de las gametas, los presuntos cigotos fueron desprovistos de la ZP con solución de pronasa. (e) Otro grupo de oocitos fue removido de las células del cúmulo, clasificado como maduro por la presencia del primer corpúsculo polar y también sujeto al retiro de la ZP. (f) Se procedió a realizar enucleación LZP para la obtención de ooplastos. (g) Uno (grupo 1+) o dos (grupo 2+) ooplastos fueron pegados con solución de fitohemaglutinina a un presunto cigoto de FIV. Los controles consistieron en presuntos cigotos de FIV con y sin el pulso de fusión (grupos FIV-LZPF y FIV-LZP, respectivamente). (h) Los embriones reconstruidos y los controles fueron cultivados en medio SOF en micropozos del sistema WOW. Se evaluaron las tasas de clivaje y el número de células en el día 2, y las tasas de blastocistos y el número de células en el día 7.

5.3.2. Experimento 2. Desarrollo de blastómeras individuales (BI) de los embriones sujetos a TO

Embriones clivados control LZP y sujetos a TO (día 1) fueron retirados de su cultivo y sujetos a pipeteo para desagregarlos en sus blastómeras individuales. Un grupo de embriones FIV-LZP en el día 2 (estadio de 8 células) se sometió al mismo procedimiento. Cada blastómera fue nuevamente cultivada en el sistema WOW. Se evaluó la producción de blastocistos en los días 7 y 8.

5.3.3. Experimento 3. Vitricación y TE de embriones producidos por TO

Algunos de los blastocistos de los grupos 1+ (n=5), 2+ (n=6) o FIV-LZP (n=5) obtenidos en el Experimento 1 fueron vitrificados, calentados y transferidos en vacas receptoras, debidamente sincronizadas. Se realizaron ecografías los 28 días desde las transferencias embrionarias para detectar preñeces.

5.4. MATERIALES Y MÉTODOS

5.4.1. *Colección y maduración de oocitos*

La colección y maduración de oocitos de ovarios de matadero fue descrita en la sección 2.4.2.

5.4.2. *Fertilización in vitro*

Un grupo de oocitos fue sujeto a FIV, según la sección 2.4.6.

5.4.3. *Remoción de las células del cúmulus y la ZP*

El tratamiento de los presuntos cigotas de FIV para su posterior cultivo LZP fue descrito en la sección 4.4.3.

5.4.4. *Generación de ooplastos por enucleación*

Durante la coincubación de las gametas, un segundo grupo de oocitos maduros fue sujeto a desnudación con solución de hialuronidasa y remoción de la ZP con solución de pronasa. La enucleación se realizó por microcirugía, usando dos micropipetas de vidrio: una pipeta cerrada para mover las estructuras y una pipeta abierta con punta roma para la enucleación. Los procedimientos de enucleación se realizaron en microgotas de medio TALP-H cubiertas por aceite mineral a temperatura ambiente.

5.4.5. *Transferencia de ooplastos por fusión*

Un presunto cigoto de FIV fue tratado por algunos segundos con solución de fitohemaglutinina (300 mg/mL), una lectina que permite la adhesión de membranas. Inmediatamente después, el embrión fue puesto en contacto con uno (grupo 1+) o dos (grupo 2+) ooplastos, quedando las estructuras adheridas. Las construcciones fueron equilibradas en medio de fusión (0,3 M manitol, 0,1 mM de MgSO₄, 0,05 mM de CaCl₂ y 1mg/mL de PVA) durante 2 a 3 min y luego colocadas con el plano de contacto de membranas en paralelo a los electrodos (0,5 mm) en una cámara de fusión (División de Instrumentos de BTX; Harvard Apparatus, Holliston, MA, EE.UU.) que contenía 2 mL del mismo medio atemperado. Las condiciones de fusión fueron 2 pulsos de 60V de 30 µseg a

un intervalo de 100 mseg. Después de la exposición al pulso eléctrico, los embriones fueron retornados a cultivo y 30 min después, los embriones que se visualizaron como una única estructura se consideraron fusionados. Un grupo de presuntos cigotos de FIV sujetos al mismo pulso eléctrico (grupo FIV-LZPF), un grupo de FIV-LZP (sin fusión de ooplasmas) y un grupo de embriones de FIV estándar, con ZP fueron usados como controles. Los embriones control y reconstruidos fueron cultivados como se describe en la sección 4.4.4. El diámetro celular fue determinado con un ocular con regla, inmediatamente después de la fusión.

5.4.6. *Tinción para recuento celular*

Blastocistos día 7 fueron teñidos en su gota de cultivo con 1 mg/ mL de Hoescht 33342 (H33342) durante 10 min. Posteriormente, los blastocistos fueron colocados entre un cubre y un portaobjetos y se visualizaron bajo luz UV empleando un microscopio invertido. Se tomaron fotografías que fueron analizadas digitalmente para el recuento de núcleos teñidos de los blastocistos obtenidos.

5.4.7. *Desarrollo de blastómeras individuales*

Mediante fuerte pipeteo se desagregaron las blastómeras de embriones clivados en el día 1 post-FIV de los grupos 1+, 2+ y FIV-LZP, que se encontraban en estadio de 2 a 4 células. Las blastómeras individuales fueron cultivadas como se describe en la sección 4.4.4.

5.4.8. *Cultivo embrionario*

Los presuntos cigotos del grupo FIV-ZP fueron cultivados como se describe en la sección 2.4.7. Se evaluó la tasa y el número de células de los blastocistos obtenidos en el Día 7. Los embriones y blastómeras individuales LZP se detalló en la sección 4.4.8. Se evaluaron el clivaje y número de células de los embriones LZP en el día 2 y las tasas de producción de blastocistos y el número total de células de los mismos en el día 7.

5.4.9. *Vitrificación de embriones LZP*

El método de vitrificación empleado para los embriones LZP fue descrito en la sección 4.4.5.

5.4.10. *Sincronización de hembras receptoras*

Las vacas receptoras de embriones correspondieron a razas Holando y cruzas en excelente estado físico y nutricional. Las mismas fueron sincronizadas con dos dosis de 2 mL cada una de prostaglandina. La segunda inyección fue realizada 3 días antes de la FIV. La primera dosis fue administrada entre 11 y 14 días antes de la fecha fijada para la FIV. Se controló celo durante el día de la FIV y los días previo y posterior a la FIV (receptoras con úteros de días 7, 8 y 6, respectivamente para el momento de la TE). Blastocistos día 7 fueron transferidos en todos los casos, pertenecientes a los grupos 1+ (n = 5), 2+ (n = 6) y FIV-LZP (n = 5).

5.4.11. *Calentamiento de embriones*

El método de calentamiento empleado para los embriones LZP fue descrito en la sección 4.4.5. Finalmente, un grupo de embriones fue colocado en gotas de cultivo de medio SOF.

5.4.12. *Transferencia de embriones vitrificados y calentados*

Otro grupo de embriones calentados fue inmediatamente cargado en forma individual en pajuelas de 0,25 mL en medio *Syngro Holding (Bioniche Life Science Inc., Bellville, Ontario, Canadá)* y transportados en una transportadora de embriones a 37°C (Watanabe, Brasil) para su colocación en vacas receptoras debidamente sincronizadas en un campo perteneciente a Cabaña Beatriz (Colonia Aldao, Santa Fe, Argentina). El día de la transferencia fue el 21 de junio de 2013. (Figura 11).



Figura 13. Hembras receptoras. Vacas transferidas con embriones experimentales producidos por TO de uno (grupo 1+) y dos (2+) ooplastos y grupo control FIV-LZP.

5.4.13. *Análisis estadístico*

Se analizaron los cuadrados medios mínimos del diámetro, superficie y volumen de los cigotos; como también de los números de células de los blastocistos obtenidos. Dichos datos se analizaron con el procedimiento MIXED de SAS 9.1 (SAS, 2003). El modelo incluyó los efectos fijos de tratamiento y las interacciones de segundo y tercer orden. Se emplearon contrastes ortogonales para evaluar diferencias entre tratamientos. El desarrollo de los embriones y las BI fue analizado con el procedimiento descrito en la sección 2.4.10.

5.5. RESULTADOS

5.5.1. Producción de embriones reconstruidos por TO de uno (1+) o dos (2+) ooplastos en presuntos cigotos de FIV

Se determinó el diámetro (d) de los presuntos cigotos reconstruidos por TO de uno (1+) o dos (2+) ooplastos en presuntos cigotos de FIV. En la Tabla 6 se muestran las medidas obtenidas del diámetro ($d=2r$), la superficie, el volumen y la relación/superficie volumen de los presuntos cigotos como un indicativo del tamaño celular. Un presunto cigoto puede aproximarse geoméricamente a una esfera, por lo que tanto el volumen como la superficie resultan directamente proporcionales al r. Como controles se emplearon presuntos cigotos de FIV cultivados LZP sujetos o no al pulso de fusión (FIV-LZPF y FIV-LZP, respectivamente). Fue posible determinar la adición de uno y dos ooplastos aumentó el tamaño de los presuntos cigotas reconstruidos por TO.

Tabla 6. Determinación del tamaño celular. Se midió el diámetro ($d=2r$) de los presuntos cigotos de FIV reconstruidos a partir de TO con uno (1+) o dos (2+) ooplastos y presuntos cigotos de FIV con un ocular con regla, inmediatamente después de la fusión. Presuntos cigotos de FIV cultivados LZP sujetos o no al pulso de fusión (FIV-LZPF y FIV-LZP, respectivamente) fueron empleados como controles. Se presentan los cuadrados medios mínimos y el error estándar para cada tratamiento.

Tratamiento	Nro. de presuntos cigotos medidos	Diámetro \pm ES (μm)	Sup. de la circunf. \pm ES ($\times 10^2 \mu\text{m}^2$)	Volumen \pm ES ($\times 10^4 \mu\text{m}^3$)	Sup/Vol \pm ES ($\times 10^{-4}$)
FIV-LZP	10	125,81 \pm 2,11a	124,69 \pm 4,91a	105,29 \pm 7,71a	119,65 \pm 1,69a
FIV-LZPF	10	127,43 \pm 2,11a	127,75 \pm 4,91a	109,00 \pm 7,71a	117,99 \pm 1,69a
1+	15	156,46 \pm 1,72bc	192,43 \pm 4,00bc	201,25 \pm 6,30bc	96,00 \pm 1,38bc
2+	10	180,66 \pm 2,11bd	256,52 \pm 4,91bd	309,76 \pm 7,71bd	83,13 \pm 1,69bd

ES = Error estándar; (a,b,c,d): Valores con distintas letras difieren significativamente ($P<0,05$).

En la Tabla 7, se muestran los resultados obtenidos respecto del clivaje y el número de células en el día 2 de los embriones producidos por TO y sus respectivos controles. El clivaje disminuyó significativamente de acuerdo con el aumento de volumen embrionario. Los grupos control FIV-LZP y FIV-LZPF no presentaron diferencias significativas (346/398, 87% de embriones clivados en el grupo FIV-LZP y 89/97, 92% en el grupo FIV-LZPF). Sin embargo, la adición de 1 y 2 ooplastos (grupo 1+ y 2+, respectivamente) produjo un descenso significativo ($P < 0,05$) de la tasa de clivaje (200/267, 75% y 137/228, 60%), respectivamente). Por otro lado, los grupos 1+ y 2+ mostraron un mayor número de células (más de 9 células) en el día 2 (99/200 y 67/137, respectivamente; representando casi un 50% de los embriones clivados para ambos casos) que los embriones control FIV-LZP y FIV-LZPF. Por el contrario, la mayor proporción de embriones de los grupos control mostró de 5 a 8 células en el día 2 (177/346 en el grupo FIV-LZP y 52/89 en el grupo FIV-LZPF; representando más del 50% para cada caso). Es decir, que más del 50% de los embriones de los grupos 1+ y 2+ sufrieron una o dos divisiones mitóticas más ($P < 0,05$).

Tabla 7. Clivaje y número de células en el día 2 de los embriones producidos por TO. Se determinaron las tasas de clivaje y el número de células en el día 2 de los embriones reconstruidos por TO mediante fusión de uno (grupo 1+) o dos (grupo 2+) ooplastos a un presunto cigoto de FIV. Los controles consistieron en presuntos cigotos de FIV cultivados LZP sujetos o no al pulso de fusión (FIV-LZPF y FIV-LZP, respectivamente).

Tratamiento	n	Clivaje (%*)	Nro. de células en el día 2 (%**)			
			2 a 4	5 a 8	9 a 16	>16
FIV-LZP	398	346 (87)a	53 (15)a	177 (51)a	112 (32)a	4 (1)a
FIV-LZPF	97	89 (92)a	15 (17)a	52 (58)a	21 (24)a	1 (1)a
1+	267	200 (75)bc	44 (22)b	57 (28)b	80 (40)b	19 (9)b
2+	228	137 (60)bd	34 (25)b	36 (26)b	50 (36)b	17 (12)b

*Porcentajes de acuerdo al número de embriones total (n); **Porcentajes respecto del número de embriones clivados. (a,b,c,d): Valores con distintas letras difieren significativamente ($P < 0,05$).

Las tasas de clivaje y formación de blastocistos totales fueron significativamente mayores en los grupos controles FIV-LZP (370/424, 87% y 137/424, 32%, respectivamente) y FIV-LZPF (78/85, 92% y 24/85, 28%, respectivamente) (Tabla 8). El aumento de citoplasma produjo una disminución significativa ($P<0,05$) y lineal tanto en el clivaje como en los embriones obtenidos a partir de los grupos experimentales 1+ (161/221, 73% y 47/221, 21%, respectivamente) y grupo 2+ (141/243, 58% y 36/243, 15%). La producción de blastocistos en el grupo de embriones de FIV-ZP no varió de los grupos FIV-LZP y FIV-LZPF (Tabla 8).

Tabla 8. Tasas totales de clivaje en el día 2 y producción de blastocistos en el día 7. Se determinaron las tasas de clivaje y producción de blastocistos de los embriones reconstruidos por TO mediante fusión de uno (grupo 1+) o dos (grupo 2+) ooplastos a un presunto cigoto de FIV. Los controles consistieron en presuntos cigotos de FIV cultivados LZP sujetos o no al pulso de fusión (FIV-LZPF y FIV-LZP, respectivamente) y embriones de FIV convencionales cultivados con ZP (FIV-ZP).

Tratamiento	n	Clivaje (%)	Nro. de blastocistos (%)	Blastocistos/clivados (%)
FIV-LZP	424	370 (87)NE	137 (32)NE	137/370 (37)
FIV-LZPF	85	78 (92)NE	24 (28)NE	24/78 (31)
1+	221	161 (73)a	47 (21)a	47/161 (29)
2+	243	141 (58)b	36 (15)b	36/141 (25)
FIV-ZP	397	323 (81)NE	143 (36)NE	143/323 (44)

(a,b): Valores con distintas letras difieren significativamente ($P<0,05$). NE: No estimable.

En la Tabla 9 se realizó una asociación entre el número de células en el día 2 de desarrollo y la producción de blastocistos. El mayor porcentaje de blastocistos fue obtenido de los subgrupos que contaban con un incremento del número de células en el día 2. Es decir, cuanto mayor el número de células en el día 2, mayores las posibilidades de ese embrión de desarrollar hasta el estadio de blastocisto. La mayoría de los blastocistos obtenidos en del grupo control FIV-LZP (63%) contaba con 5 a 8 células en el día 2; mientras que el 32% estaba en estadio de 9 a 16 células. Un comportamiento semejante fue observado en el grupo FIV-LZPF. Los grupos experimentales 1+ y 2+ presentaron diferencias significativas respecto de los embriones con más de 16 células al día 2. El 11% en el grupo 1+ y el 29% en el grupo 2+ de estos embriones más avanzados dieron lugar a la formación de blastocistos.

Tabla 9. Asociación entre el número de células en el día 2 y la formación de blastocistos en el día 7. Se analizó número de células en el día 2 de los blastocistos obtenidos reconstruidos por TO mediante fusión de uno (grupo 1+) o dos (grupo 2+) ooplastos a un presunto cigoto de FIV. Los controles consistieron en presuntos cigotos de FIV cultivados LZP sujetos o no al pulso de fusión (FIV-LZPF y FIV-LZP, respectivamente).

Tratamiento	Nro. blastocistos analizados	Nro. de células en el día 2 (%)			
		2 a 4	5 a 8	9 a 16	>16
FIV-LZP	100	5 (5)	63 (63)a	32 (32)a	0 (0)NE
FIV-LZPF	24	3 (12)	13 (54)a	8 (33)a	0 (0)NE
1+	52	1 (2)	16 (31)b	29 (56)b	6 (11)NE
2+	24	1 (4)	6 (25)b	10 (42)b	7 (29)NE

(a,b): Valores con distintas letras difieren significativamente ($P < 0,05$). NE: No estimable.

En la Tabla 10 se muestran los números de células de los blastocistos obtenidos tras la TO de uno (1+) o dos (2+) ooplastos, comparados con blastocistos de FIV-LZP y FIV-ZP. Se contaron los núcleos celulares teñidos con Hoescht33342 (Figuras 14 y 15). Únicamente hubo diferencias significativas entre los grupos control de FIV con ZP y LZP ($58,26 \pm 6,65$ y $43,94 \pm 11,69$, respectivamente).

Tabla 10. Número de células de los blastocistos obtenidos. Los núcleos de las células de los blastocistos obtenidos en el día 7, reconstruidos por TO mediante fusión de uno (grupo 1+) o dos (grupo 2+) ooplastos a un presunto cigoto de FIV, fueron teñidos con Hoescht y visualizados bajo luz UV. Se contaron los núcleos teñidos de cada embrión y se calculó el promedio del número de células para cada tratamiento. Los controles consistieron en presuntos cigotos de FIV cultivados LZP (FIV-LZP) y embriones de FIV convencionales cultivados con ZP (FIV-ZP). Se presentan los cuadrados medios mínimos y el error estándar de cada tratamiento.

Grupo	n	Nro. de células (\pm ES) de los blastocistos obtenidos
FIV-LZP	18	$43,94 \pm 4,65a$
1+	10	$60,80 \pm 6,24$
2+	4	$56,50 \pm 9,87$
FIV-ZP	19	$58,26 \pm 4,53b$

ES = Error estándar; (a,b): Valores con distintas letras difieren significativamente ($P < 0,05$).

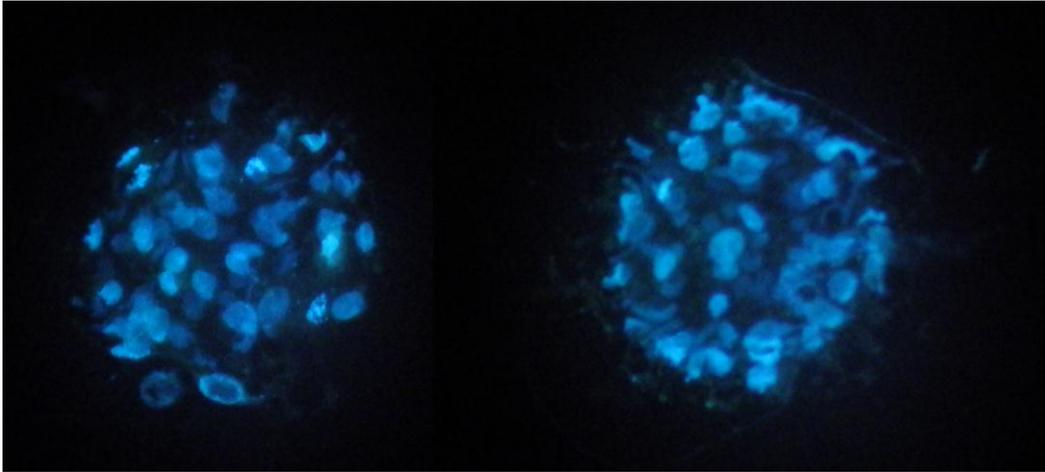


Figura 14. Blastocistos del grupo FIV-LZP teñidos con H33342. Se muestran los núcleos de las células de dos blastocistos en el día 7 pertenecientes al grupo control de FIV cultivados LZP. Cada blastocisto cuenta con 48 núcleos teñidos, lo que representa 48 células.

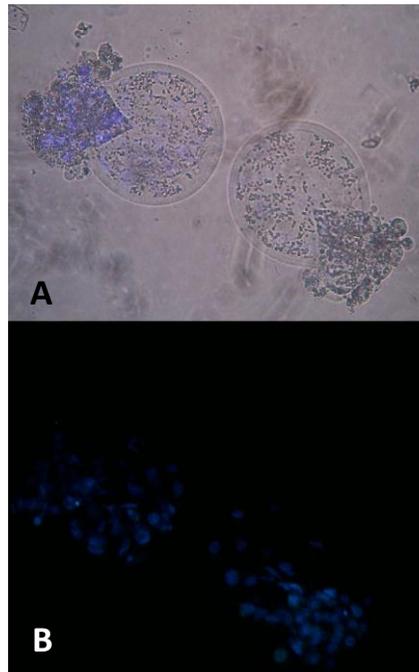


Figura 15. Blastocistos del grupo FIV-ZP teñidos con H33342. (A) Blastocistos observados con luz normal. (B) Blastocistos observados bajo luz UV.

5.5.2. Desarrollo de blastómeras individuales de los embriones sujetos a TO

El desarrollo hasta estadio de blastocisto de blastómeras individuales (BI) desagregadas de embriones de los grupos 1+, 2+ y FIV-LZP se muestra en la Tabla 11. De un total de 23 embriones desagregados (56 BI) del grupo FIV-LZP resultaron 25 blastocistos (109%). Si bien esta tasa fue mayor que en los demás grupos experimentales, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. En el grupo 1+ se separaron 11 embriones, de los que se obtuvieron 38 BI y 1 blastocisto (3%); mientras que en el grupo 2+, de 18 BI (7 embriones) solo se obtuvo un blastocisto (1/7, 14%).

Tabla 11. Desarrollo de blastómeras individuales (BI). Se desagregaron y cultivaron individualmente las blastómeras de embriones día 1 reconstruidos por TO mediante fusión de uno (grupo 1+) o dos (grupo 2+) ooplastos a un presunto cigoto de FIV. El control consistió en embriones de FIV cultivados LZP (FIV-LZP), también desagregados en el día 1.

Grupo	Estadio	n	Nro. de blastómeras	Nro. de blastocistos (%)	Blastocistos/n (%)
FIV-LZP	2c	18	36	19 (53)	19/18 (106)
	4c	5	20	6 (30)	6/5 (120)
1+	2c	3	6	0 (0)	0 (0)
	4c	8	32	1 (3)	1/8 (12)
2+	2c	5	10	0 (0)	0 (0)
	4c	2	8	1 (12)	1/2 (50)

No hubo diferencias significativas entre los tratamientos realizados.

5.5.3. Vitricación y TE de embriones producidos por TO

No se detectaron preñeces en las ecografías realizadas.

5.6. DISCUSIÓN

El oocito tiene un papel fundamental en los primeros estadios del desarrollo embrionario (Battaglia y col., 1996; Sirard y col., 2006). Además, el volumen del oocito se relaciona directamente con la posterior capacidad de desarrollo embrionario (Zakhartchenko y col., 1997; Murakoshi y col., 2013) y con la cantidad de mitocondrias presentes (Smith y Alcivar, 1993).

La transferencia de uno (grupo 1+) y dos (grupo 2+) ooplastos nos permitió generar embriones de mayor tamaño (Tabla 6). Sin embargo, contrariamente a lo esperado, no fue posible obtener blastómeras más competentes (Tabla 11), sino aceleración de la cinética de desarrollo, específicamente en el día 2 (Tabla 7). De esta forma, los embriones de los grupos 1+ y 2+, también experimentaron una o dos divisiones celulares más (representado por un mayor número de células en el día 2). El análisis entre el número de células en el día 2 y la proporción de blastocistos obtenidos (Tabla 8) queda demostrado que aquellos embriones de los grupos experimentales 1+ y 2+, acelerados en el desarrollo, alcanzaron satisfactoriamente el estadio de blastocisto. Por lo tanto, en nuestras condiciones, es posible descartar la fragmentación citoplasmática, factor que provoca distorsión de los planos de división de las blastómeras (Keltz y col., 2006).

Asimismo, la TO fue perjudicando de manera significativa y lineal la competencia embrionaria (Tabla 7). Es posible plantear varias hipótesis en torno a la disminución en la producción de embriones por TO para los grupos 1+ y 2+, algunas de las cuales pueden ser refutadas. Por un lado, las mitocondrias presentes en el oocito tienen un papel relevante para el desarrollo embrionario, tal como ha sido demostrado por otros grupos de investigación (Smith y Alcivar, 1993; Chan y col., 2005). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han centrado en el rol mitocondrial por defecto (mitocondrias no funcionales o depleción de mitocondrias) o bien en clonación interespecífica, sugiriendo que la adición de cantidades de ooplasma mayores al 10 o 15% pueden modificar la composición del cigoto e incluso detener su desarrollo (Chiaratti y col., 2010a). No existen estudios previos que analicen el efecto de un exceso de citoplasma o mitocondrias funcionales en embriones

reconstruidos por TO de la misma especie. En este sentido, en nuestra experiencia, si bien no fueron estudiadas las variantes alélicas mitocondriales, se podría descartar la posibilidad de tener incompatibilidades entre mitocondrias que estén afectando el desarrollo embrionario. En este trabajo, se emplearon oocitos provenientes de ovarios de matadero que representan alta variabilidad de alelos, ya que las vacas enviadas a faena son en su mayoría raza *Bos taurus* y cruza. Al mismo tiempo, podría descartarse un efecto negativo en el desarrollo de los grupos 1+ y 2+ debido a un exceso mitocondrial, dado que la concentración de mitocondrias por volumen de citoplasma se estaría manteniendo. Asimismo, el grupo FIV-LZPF, donde los presuntos cigotos recibieron el mismo pulso eléctrico que los grupos experimentales, permite descartar una incidencia negativa de la tensión aplicada en el desarrollo de los embriones producidos. Las tasas de blastocistos obtenidas entre el grupo FIV-LZP y FIV-LZPF no tuvieron diferencias significativas, indicando que los factores implicados en la disminución del desarrollo se deben a la adición de ooplastos.

Por otro lado, la transferencia de ooplasmas ha sido empleada eficientemente en clínicas de reproducción humana, donde la transferencia de pequeñas cantidades de ooplasma de un oocito donante o un cigoto puede cambiar el funcionamiento de un oocito comprometido y resultar en nacimientos normales (Barrit y col., 2001b). En este trabajo, ni los oocitos donantes de ooplastos ni los presuntos cigotos fueron clasificados como “comprometidos en el desarrollo” o “normales y saludables”. En este sentido, sería sumamente útil comprobar la eficiencia de la técnica en ovarios de hembras prepúberes, cuyos resultados de FIV resultan más bajos (Salamone y col., 2001). Ha sido reportado que la fusión de distintos oocitos puede promover la capacidad de desarrollo (Liu y Keefe, 2000) y la densidad celular (Tecirlioglu y col., 2005); pero la combinación impredecible de oocitos incompatibles, con distintas capacidades de desarrollo o distintos grados de maduración puede tener un efecto nocivo (Vajta y col., 2005). Por lo tanto, la disminución progresiva de la competencia en el desarrollo de embriones de los grupos 1+ y 2+ podría atribuirse al incremento de las combinaciones entre ooplasmas, que aumentan también las variables para el desarrollo: cuando se combinan dos oocitos, existe la posibilidad de que ambos sean buenos (éxito en el desarrollo), malos (fracaso en el desarrollo) o uno malo y

uno bueno (cuyo desarrollo es impredecible). La combinación de 3 citoplasmas resulta en más combinaciones aleatorias. Aún así, esta observación se contradice con trabajos de clonación realizados por HMC, donde el aumento del volumen embrionario incrementó el potencial de desarrollo y la densidad celular (Misica-Turner y col., 2007; Oback y Wells, 2003; Vajta y col., 2003; De Souza y col., 2009). Además, Bowles y col. (2008) estudiaron el desarrollo embrionario de clones producidos por HMC y, en su experiencia, la combinación de fracciones de 2 y 3 citoplasmas aumentó significativamente la producción de clones (Bowles y col., 2008).

En humanos, un mayor volumen del oocito ha sido asociado con mayor velocidad de clivaje, mayor número de copias de ADNmt y mejoras en las tasas de preñez (Murakoshi y col., 2013). El aumento del diámetro del oocito es determinante en la adquisición de la competencia ovocitaria en cabras (Crozet y col., 2000); mientras que en porcinos se asocia con mejoras en la fecundación (El Shourbagy y col., 2006). Sin embargo, poco ha sido estudiado respecto del volumen del cigoto y el tamaño de las blastómeras del embrión. Paradójicamente, en nuestras observaciones, un aumento del r (y d) del presunto cigoto de FIV reconstruido disminuyó la competencia para el desarrollo (Tabla 6), produciendo menores tasas de clivaje y de blastocistos. Una disminución de la relación superficie de membranas/volumen del embrión podría interpretarse mediante el hecho de que un mayor volumen disminuye la superficie de contacto con el medio externo y, con ello, podrían afectarse los fenómenos de intercambio de gases y nutrientes.

Asimismo, el número de células de los blastocistos obtenidos solo presentó diferencias significativas entre los grupos control de FIV con ZP y LZP. La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que ocurre espontáneamente en niveles fisiológicos durante el desarrollo normal de los embriones preimplantatorios (Fabian y col., 2005a; 2005b). Este proceso se encuentra altamente conservado, ya que actúa como un mecanismo de control de calidad, eliminando aquellas células dañadas o no funcionales, contribuyendo a la homeostasis o equilibrio celular (Jacobson y col., 1997). Por lo tanto, el número de células final de los blastocistos obtenidos no estaría brindando una información clara ni

sobre el desarrollo embrionario ni sobre la fragmentación celular, en caso de haber ocurrido, ya que aquellas células defectuosas serían eliminadas.

Como se describió en la sección 1.2.2., el oocito maduro se encuentra detenido en MII debido a los niveles altos del factor MPF activo. La fusión con el espermatozoide le permite concluir su meiosis, debido a que genera oscilaciones fisiológicas de Ca^{+2} que inhiben la fosforilación y síntesis de proteínas, principalmente MPF. En este sentido, otra alternativa para explicar la disminución en la producción de embriones de los grupos 1+ y 2+ podría residir en los niveles altos de MPF en los ooplastos que estarían diluyendo los factores de activación del presunto cigoto recién fecundado. Sin embargo, tanto el proceso de enucleación como el de fusión podrían estar estimulando la disminución de los niveles de MPF. Ha sido demostrado que un pulso eléctrico no es suficiente para activar el oocito bovino enucleado en procesos de TNCS, necesitando de un protocolo de activación química adicional (Collas y col., 1993; Cheong y col., 2002). Sin embargo, en otras especies como el cerdo y el conejo, es posible realizar este tipo de activación satisfactoriamente mediante la aplicación de un determinado voltaje, comprobando que existe liberación de Ca^{+2} intracelular (Ozil, 1990; Kragh y col., 2005). Asimismo, la fusión (que genera poros en la membrana celular) permitiría el ingreso de Ca^{+2} del medio externo. Greising y Jonas (1999) reportaron el aumento de la capacidad de desarrollo hasta estadio de blastocisto de 2 ooplastos fusionados y activados eléctricamente empleados como receptores para el proceso de TNCS (Greising y Jonas, 1999). De todas maneras, considerando que en este caso la fusión del ooplasto se realiza con un presunto cigoto de FIV, no quedan claros ni el grado de activación necesario en el ooplasto ni la influencia de los estímulos externos para mejorar la competencia en el desarrollo. Por otra parte, de contar con un sistema eficiente de FIV en oocitos LZP, podría evaluarse la posibilidad de intercambiar el orden de los procesos y, de esta manera, primero fusionar oocitos y ooplastos, para después proceder a fecundarlos. Sin embargo, el procedimiento de FIV en oocitos LZP suele ser muy delicado, tanto en la incidencia de poliespermia como en el lavado de los presuntos cigotos.

Por otro lado, el desarrollo de embriones del grupo FIV-LZP y FIV-LZPF fue comparable con la de los embriones tradicionales con ZP, permitiendo determinar que el

sistema de cultivo WOW es altamente eficiente y no interfiere en la producción de embriones *in vitro*. Asimismo se proyecta como una herramienta interesante, no solo para el desarrollo de embriones agregados y desagregados, sino también para el seguimiento individual de embriones con ZP. Sugimura y col. (2012) plantearon un sistema de selección de los mejores embriones de FIV, combinando 5 factores de pronóstico (tiempo del primer clivaje, número de blastómeras al final del primer clivaje, fragmentación celular, cantidad de blastómeras en la fase lag y consumo de oxígeno de los blastocistos obtenidos) mediante el empleo del sistema de cultivo WOW y cinematografía (TLC, del inglés *time-lapse cinematography*) (Sugimura y col., 2012). Coincidente con esta observación, cuando se analizaron conjuntamente los datos de clivaje en el día 2 y la formación de blastocistos en el día 7, fue posible confirmar que embriones con mayor número de células en el día 2 resultan en mayores tasas de formación de blastocistos. Por lo tanto, para todos los grupos existió una correlación positiva entre estadios más avanzados de desarrollo en el día 2 y mayores tasas de blastocistos.

Si bien ha sido posible producir mellizos o cuatrillizos a partir de un único embrión, las tasas de desarrollo no han sido lo suficientemente relevantes para lograr la difusión masiva de esta técnica (Tagawa y col., 2008). En el día 1 se procedió a separar y cultivar individualmente las blastómeras de los embriones producidos. Se emplearon solo aquellos embriones que tenían un número par de células tras sus divisiones celulares, tal como fue sugerido previamente (Sugimura y col., 2012). Contrariamente a lo esperado, las blastómeras de los embriones de los grupos experimentales 1+ y 2+ no contaron con mejor capacidad de desarrollo individual. Este hecho se contradice con lo observado en humanos, donde existe una correlación positiva entre el volumen de la blastómera y el número de copias de ADNmt (Murakoshi y col., 2013). En cambio, los porcentajes de embriones obtenidos por desagregación embrionaria de los embriones FIV-LZP superaron el 100%. Este hecho, combinado al uso de semen sexado, estaría generando una gran fuente de producción de embriones del sexo y la genética deseada, al estar produciendo dos o cuatro veces más crías, por ejemplo después del mismo y único procedimiento de OPU y FIV. Sin embargo, la competencia de las BI de los embriones reconstruidos por TO decayó a niveles menores que la producción de blastocistos sin desagregación. Es necesario resaltar que

deben realizarse más repeticiones sobre este punto, con especial atención en la cinética del desarrollo, la cual está acelerada en los embriones reconstruidos por TO.

Finalmente, la TE no dio resultados de preñeces dado el bajo número de embriones transferidos y la gran cantidad de variables analizadas. Más pruebas deben llevarse a cabo para contar con resultados concluyentes en torno de esta combinación de tratamientos.

Nuestras observaciones sobre el efecto del incremento del ooplasma en cigotos por TO permiten plantear nuevos interrogantes en relación al efecto del volumen celular y embrionario en el desarrollo embrionario temprano. Si bien no fue posible multiplicar embriones a través de TO, nuestros resultados de desagregación de blastómeras de FIV LZP representan una estrategia altamente eficiente y concuerdan con los resultados recientemente reportados por Tagawa y col. (2008). Por otro lado, la combinación de este procedimiento con la FIV empleando semen sexado aún no ha sido reportada en bovinos y, probablemente tenga altas posibilidades de aplicación en la reproducción animal.

CAPÍTULO VI.

PRODUCCIÓN DE EMBRIONES QUIMÉRICOS POR AGREGACIÓN DE CÉLULAS EGFP DE EMBRIONES EN ESTADIO DE 8 CÉLULAS CON EMBRIONES FUSIONADOS EN ESTADÍO DE 2 CÉLULAS Y EMBRIONES ASINCRÓNICOS

- Los resultados parciales del trabajo de electrofusión de embriones bovinos fueron presentados en la LIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y LVII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI), llevada a cabo en la ciudad de Mar del Plata (Buenos Aires, Argentina) del 18 al 21 de noviembre de 2009 en formato póster bajo el título **Hiriart MI**, Salamone DF. Desarrollo *in vitro* de embriones bovinos electrofusionados producidos por FIV. Resumen.
- Los resultados parciales de agregación embrionaria fueron presentados durante la XXXVII Conferencia Anual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS), llevada a cabo en Orlando (Estados Unidos) del 8 al 12 de Enero de 2011.
Hiriart MI, Bevacqua RJ, Fernández y Martín R, Salamone D (2010). *Multiplication of eight cell embryos by aggregation of a single egfp-labeled blastomere with putative tetraploid embryos*. *Reprod. Fertil. Dev.*; 23(1): 168-169.
- Los resultados completos de este capítulo forman parte de la siguiente publicación.
Hiriart MI, Bevacqua RJ, Canel NG, Fernández-Martín R y Salamone DF (2013). [*Production of chimeric embryos by aggregation of bovine egfp eight-cell stage blastomeres with two-cell fused and asynchronous embryos*](#). *Theriogenology*; 80(4):357-364.

6.1. RESUMEN

La desagregación de embriones permite la producción de dos a cuatro crías idénticas a partir de un único embrión bovino. Por otro lado, la complementación de embriones se ha convertido en la técnica de elección para demostrar la totipotencialidad de CME e iPSc. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue generar un método nuevo y sencillo, por agregación en el sistema WOW, para dirigir la expresión de la proteína verde fluorescente (EGFP) de cada blastómera de un embrión bovino de FIV en estadio de 8 células al MCI de quimeras producidas con embriones fusionados y asincrónicos. Para este fin, se determinaron las mejores condiciones para generar embriones de FIV fusionados. Entonces, embriones fusionados (F) o no fusionados (NF) se agregaron en dos condiciones diferentes: sincrónicamente (S), cuando tanto los embriones transgénicos como los F fueron producidos en el mismo día; y asincrónicamente (AS), cuando los embriones transgénicos se produjeron un día antes que los embriones F. Las mayores tasas de fusión y producción de blastocistos se obtuvieron con dos pulsos de 40 V. Los grupos 2ASF y 2ASNF mostraron el mayor número de blastocistos quiméricos que expresaban la proteína EGFP (48% y 41%, respectivamente). Por otra parte, el grupo 2ASF tuvo las tasas más altas de localización en el MCI de las blastómeras expresando EGFP (6/13, 46% de los blastocistos expresando el transgén en el MCI). Esta técnica tiene gran aplicación para la multiplicación de embriones de alto valor genético e incluso embriones transgénicos, y también será de gran importancia para la clonación animal, empleando CME e iPSc.

6.2. INTRODUCCIÓN

Los embriones quiméricos, obtenidos mediante contribución de blastómeras de dos o más embriones, tienen varias aplicaciones en biotecnología básica y aplicada. Se trata de herramientas útiles para el estudio del desarrollo temprano y la diferenciación en mamíferos (Mc Laren, 1975). Por otra parte, la introducción de CME transgénicas en blastocistos es el método de preferencia para obtener ratones transgénicos (Gossler y col., 1986; Robertson y col., 1986; Beddington y Robertson, 1989). Además, con el desarrollo de la tecnología de las iPSc (Takahashi y Yamanaka, 2006), la complementación trofoblástica de embriones se ha convertido en la técnica de elección para demostrar su totipotencialidad (Tong y col., 2011; Li y col., 2011; Kang y col., 2011).

Desde principios de los años 80, dos técnicas han sido utilizadas para la bisección de embriones: el corte (Ozil, 1983; Williams y col., 1984; Picard y col., 1990; Rho y col., 1998) y la desagregación (Willadsen, 1979; Willadsen y Polge, 1981; Johnson y col., 1995). Ambas tecnologías permiten la generación de gemelos a partir de un solo embrión. Un método alternativo desarrollado para reducir el daño inducido por la microcirugía (Heyman, 1985; Skrzyszowska y Smorag, 1989) consiste en la perforación de la ZP entre el MCI y el trofoblasto, para inducir la eclosión asistida del blastocisto y asegurar la extrusión de ambos tipos celulares (Skrzyszowska y col., 1997). En este mismo sentido, el sistema WOW, desarrollado para el cultivo de embriones LZP (Vajta y col., 2000) ha facilitado las técnicas de complementación (Tagawa y col., 2008), ya que permite combinar blastómeras desagregadas mediante pipeteo. Para el sistema WOW, con una pipeta cerrada se realizan microdepresiones circulares en una placa de cultivo, que luego son rellenadas con medio de cultivo. El cultivo de los embriones en estos pequeños pozos evita la segregación de las blastómeras, dado que hay ausencia de uniones intercelulares en las etapas embrionarias tempranas.

Por desagregación embrionaria ha sido posible obtener de dos a cuatro descendientes idénticos en vacas (Willadsen y Polge, 1981; Johnson y col., 1995; Tagawa y col., 2008), ovejas (Willadsen, 1981) y conejos (Moore y col., 1968), a partir de células de

embriones en estadio de 2, 4 y 8 células. Incluso en humanos se ha demostrado que cada una de las 4 blastómeras de un embrión en estadio de 4 células tiene el potencial de convertirse en un blastocisto individual (Van de Velde y col., 2008). Sin embargo, tanto la iniciación de la AGE como el tamaño de las blastómeras pueden limitar la división embrionaria. Varios autores han informado que la expresión génica en el embrión bovino comienza en el estadio de 8 células (Crosby y col., 1988; Frei y col., 1989; Mermili y col., 1999). Por otro lado, a pesar de que la AGE en el murino se produce durante la primera división mitótica (Golbus y col., 1973; Braude y col., 1979), blastómeras de embriones en estadio de 8 células han generado líneas de CM (Chung y col., 2006; Wakayama y col., 2007), indicando persistencia de totipotencialidad.

En ratones, se sabe que blastómeras poliploides son excluidas de los tejidos fetales (Lu y Market, 1980) durante el desarrollo, pero persisten en las membranas extraembrionarias (Tarkowsky y col., 1977). Por esa razón, los embriones poliploides (en particular embriones tetraploides o $4n$) han sido ampliamente utilizados para compensar la letalidad embrionaria de unas pocas CM y para producir descendencia homogénea a partir de embriones quiméricos (Nagy y col., 1990). En varias especies, la generación de embriones $4n$ por electrofusión (Curnow y col., 2000; Suo y col., 2000) ha demostrado ser más eficaz que el uso de drogas, como la citocalasina B (Tarkowsky y col., 1977; Ueda y col., 1995).

6.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.3.1. Experimento 1. Determinación de las mejores condiciones para la fusión de embriones bovinos en estadio de 2 células

Embriones de dos células (día 1) producidos por FIV se sometieron a dos pulsos de diferentes voltajes (20V, 40V, 60V, 80V y 100V) durante 30 μ seg a intervalos de 100 mseg. Los embriones que se visualizaron como una sola blastómera una hora más tarde se consideraron fusionados (F). El desarrollo de blastocistos se evaluó en el día 8. Embriones de FIV no fusionados (NF) se utilizaron como control.

6.3.2. Experimento 2. Determinación de la ploidía de embriones fusionados en estadio de 2 células

Se realizaron análisis de cariotipos para determinar la fusión nuclear. Se evaluaron extendidos de los embriones día 2 fusionados y de FIV control.

6.3.3. Experimento 3. Agregación sincrónica y asincrónica de blastómeras expresando egfp con embriones fusionados o no fusionados y localización de la expresión del transgén

Se produjeron embriones que expresaban el transgén *egfp* mediante inyección de vesículas de oolema coincubadas con el plásmido lineal PCX-EGFP en presuntos cigotos de FIV. Las blastómeras de embriones transgénicos día 3 se separaron mediante pipeteo y aquellas que expresaban *egfp* fueron seleccionados para la agregación con uno o dos embriones de FIV, F o NF, en diferentes etapas del desarrollo: sincrónico (S; cuando la edad de los embriones era la misma que la blastómera agregada) o asincrónico (AS; cuando los embriones eran un día más jóvenes que la blastómera que expresaba el transgén) (Figura 16).

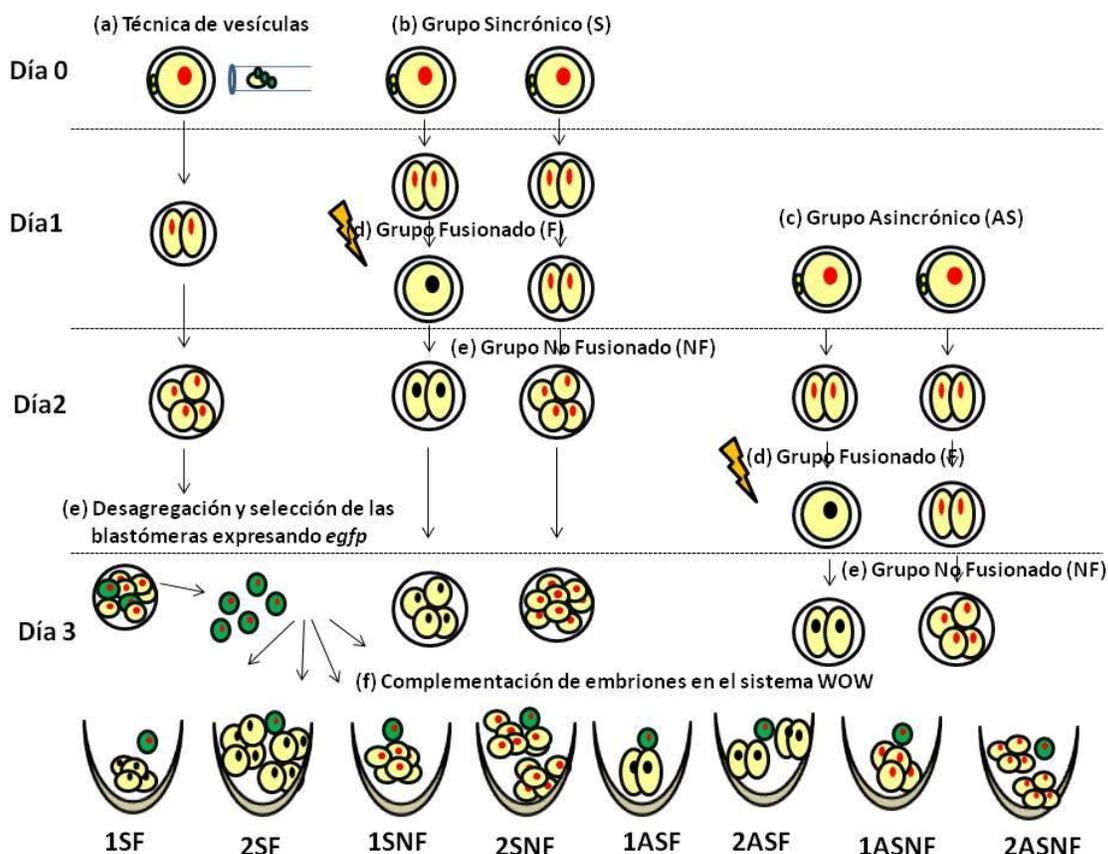


Figura 16. Diseño experimental para la generación de quimeras transitorias. (a) Presuntos cigotos de FIV fueron inyectados con vesículas de ooplasma coincubadas con el plásmido lineal pCX-EGFP. Los embriones de FIV en estadio de 2 células fueron sometidos a electrofusión (F) a 40V de 2 formas: (b) Grupo Sincrónico (S): La edad de los embriones de FIV fue la misma que la de los embriones sometidos a la técnica de vesículas o (c) Grupo Asincrónico (AS): Los embriones de FIV fueron un día más jóvenes que los embriones expresando el transgén. (d) Embriones de FIV no fusionados (NF) fueron empleados como control. (e) En el día 3, se aplicó pipeteo fuerte para desagregar las blastómeras de los embriones transgénicos en estadio de 5 a 8 células. Las blastómeras expresando *egfp* fueron seleccionadas como blastómeras fundadoras para la posterior agregación en el sistema WOW. (f) Después de la remoción de la ZP de los grupos de embriones S o AS, F o NF, 1 o 2 embriones fueron agregados con una única blastómera de un embrión en estadio de 5 a 8 células, que expresaba el transgén *egfp*.

6.4. MATERIALES Y MÉTODOS

6.4.1. *Colección y maduración de oocitos*

La colección y maduración de oocitos se describió en la sección 2.4.2.

6.4.2. *Fecundación in vitro*

Se realizó el procedimiento descrito en la sección 2.4.6. Después de la FIV, los embriones fueron designados para dos grupos: algunos embriones fueron sometidos inmediatamente a la técnica de inyección de vesículas expuestas con el plásmido pCX-EGFP y otros se cultivaron para electrofusión en el día 1 del desarrollo embrionario, como se describe a continuación en la sección 6.4.9.

6.4.3. *Remoción de las células del cúmulus*

Tras la FIV, un grupo de presuntos cigotos fue agitado mecánicamente durante 2 min en solución de hialuronidasa (1 mg/mL en PBS), para eliminar las células del cúmulus. Luego, los presuntos cigotos se lavaron en TALP-H, se seleccionaron por la visualización de al menos un corpúsculo polar e inmediatamente se inyectaron con vesículas de oolema incubadas con el plásmido pCX-EGFP.

6.4.4. *Producción de vesículas e incubación con ADN exógeno*

El plásmido utilizado fue pCX-EGFP (amablemente provisto por el Dr. Masaru Okabe) que codifica para la proteína verde fluorescente (EGFP) bajo el control del promotor quimérico citomegalovirus- β -actina de pollo (Ikawa y col., 1995). La expresión de *egfp* es fácilmente detectable bajo microscopio de epifluorescencia. Se empleó el plásmido pCX-EGFP linealizado por digestión con la enzima de restricción HindIII.

Los oocitos que se utilizaron como donantes de vesículas también se sometieron a MIV, FIV y tratamiento con hialuronidasa. Luego, los presuntos cigotos fueron transferidos a gotas de 20 μ L de TALP-H. Cada uno fue sometido a la técnica de descrita por Pereyra-Bonnet y col. (2011). Brevemente, un presunto cigoto fue sostenido bajo presión negativa con una pipeta de sujeción mientras fue atravesado con una pipeta de 9 micras a través de la

ZP hasta el contacto con el ooplasma. Una pequeña fracción del ooplasma (<10 micras) fue luego aspirado por presión negativa, evitando la rotura de la membrana plasmática. Aproximadamente 15 vesículas se obtuvieron de cada presunto cigoto donante. Las vesículas que se formaron dentro de la pipeta se transfirieron a gotas de 3 μ L con 10% de PVP, que contenían 50 ng/ μ L del plásmido pCX-EGFP lineal y se dejaron allí durante 5 min (incubación del plásmido). Por último, las vesículas se aspiraron con la pipeta de 9 micras y se inyectaron directamente en los oocitos fecundados y desnudados. Los presuntos cigotos fueron posteriormente cultivados como se describe a continuación en la sección 6.4.9.

6.4.5. *Electrofusión y cultivo in vitro de embriones fusionados*

Aproximadamente entre las 27 y 29 h después del inicio de la incubación esperma-óvulos (embriones día 1), se seleccionaron los embriones que se encontraban en estadio de 2 células. Antes de la electrofusión, estos embriones fueron sometidos a tratamiento con solución de hialuronidasa para la remoción de las células del cúmulus, equilibrados en medio de fusión (0,3 M de manitol, 0,1 mM de $MgSO_4$, $CaCl_2$ 0,05 mM y 1mg/mL de PVA) durante 2 a 3 min y luego colocados con el plano de clivaje en paralelo a los electrodos (0,5 mm entre ambos) en una cámara de fusión (División de Instrumentos de BTX; Harvard Apparatus, Holliston, MA, EE.UU.) que contenía 2 ml del mismo medio temperado. Para la fusión se utilizaron diferentes niveles de campo eléctrico: dos pulsos eléctricos de 20V, 40V, 60V, 80V o 100V de 30 μ seg a intervalos de 100 mseg. Después de la exposición al pulso eléctrico, los embriones fueron retornados a cultivo y una hora después, los embriones que se visualizaron como una única blastómera se consideraron fusionados. Como control se emplearon embriones en estadio de 2 células que no fueron sometidos a electrofusión.

6.4.6. *Análisis de la carga cromosómica de los embriones fusionados*

Embriones con ZP, día 1 y 2 post-fusión, fueron incubados en gotas de 50 μ L de medio SOF suplementadas con 2,5 μ L de colchicina (C3915) (stock: 25 μ g/mL). Posteriormente, los embriones fueron incubados en una placa con 3 mL de medio hipotónico (citrato de sodio 0,9% p/v en agua bidestilada) a 37°C durante 13 min. Luego,

cada embrión fue colocado sobre un portaobjetos, con el mínimo volumen de medio posible. Antes de secar completamente el medio, se depositó sobre ellos una gota de medio Carnoy (solución 1:3 ácido acético glacial:metanol) y se aguardó hasta el secado completo. Finalmente, la tinción se realizó con una solución de Giemsa 5% v/v en agua bidestilada por 10 min. Una vez seca la muestra, se buscaron los embriones bajo lupa estereoscópica y se fotografiaron las metafases teñidas bajo aumento de 1000X. Se analizaron digitalmente las imágenes para determinar la ploidía celular.

6.4.7. Separación y selección de blastómeras expresando *egfp*

Embriones de 3 días producidos por la técnica de inyección de vesículas y seleccionados por expresar la proteína EGFP, se trataron con 1,5 mg/mL de solución de pronasa disuelta en TALP-H para eliminar la ZP. Mediante fuerte pipeteo se desagregaron las blastómeras de estos embriones que se encontraban en estadio de 5 a 8 células. Las blastómeras expresando *egfp* se seleccionaron bajo luz azul utilizando un filtro de excitación a 488 nm y un filtro de emisión a 530 nm y luego se emplearon como blastómeras fundadoras para la agregación.

6.4.8. Agregación

Se incluyeron dos grupos de agregación para los embriones fusionados (F): 1) Sincrónica (S), cuando tanto los embriones transgénicos como los F se produjeron en el mismo día y 2) Asincrónica (AS), cuando los embriones transgénicos se produjeron un día antes que los embriones F. Por lo tanto, los embriones del grupo AS eran más jóvenes y contaban con menor número de células. Los controles consistieron en agregación S y AS con embriones de FIV no fusionados (NF). Después de la eliminación de la ZP, uno o dos embriones, F o NF, en forma S o AS, fueron agregados en una versión modificada del sistema WOW (Vajta y col., 2000) (como se describe a continuación), con una blastómera expresando *egfp* de embriones en estadio de 5 a 8 células (embriones de día 3). La blastómera se puso en contacto con un embrión o entre dos embriones (Figura 16). Se analizó el desarrollo *in vitro* hasta el estadio de blastocistos de los embriones agregados y la localización de la expresión de *egfp*.

6.4.9. *Cultivo de embriones in vitro*

Los presuntos cigotos obtenidos por FIV, FIV e inyección de vesículas y FIV fusionados se cultivaron en gotas de 50 μ L de medio SOF suplementado con 2,5% de SFB a 39°C en atmósfera humidificada con 6,5% de CO₂. Se evaluó clivaje en el día 2 únicamente para el grupo de FIV con inyección de vesículas (datos no mostrados) y la tasa de blastocistos en el día 7 para el grupo de embriones de FIV fusionados. Los embriones agregados se cultivaron en medio SOF en un sistema similar al WOW (Vajta y col., 2000), según se describió en la sección 4.4.4. Se evaluó la formación de blastocistos en los días 5 y 6 posteriores a la agregación.

5.4.10. *Análisis estadístico*

El desarrollo embrionario *in vitro* se comparó mediante el procedimiento descrito en la sección 2.4.10.

6.5. RESULTADOS

6.5.1. *Determinación de las mejores condiciones para la fusión de embriones bovinos en estadio de 2 células*

En el primer experimento, se evaluaron las mejores condiciones para generar embriones potencialmente tetraploides (4n) viables por fusión de embriones de 2 células. Para este fin, diferentes intensidades de campo eléctrico se evaluaron para embriones de FIV desnudos en estadio de 2 células (22 h después de la FIV). La fusión a 20V redujo significativamente el número de embriones fusionados, mientras que la aplicación del pulso a 80V resultó en las mayores tasas de fusión ($P < 0,05$, Tabla 12). Sin embargo, el desarrollo del embrión hasta el estadio de blastocisto tendió a verse comprometido. Por esa razón, se emplearon 40V para los siguientes experimentos. Esta intensidad dio como resultado no sólo altas tasas de fusión, sino también tasas de blastocistos que no difirieron significativamente del control.

Tabla 12. Desarrollo *in vitro* de embriones bovinos en estadio de 2 células fusionados con diferentes intensidades de campo eléctrico. Embriones en estadio de 2 células (día 1) producidos por FIV fueron sometidos a 2 pulsos de diferentes voltajes (20V, 40V, 60V, 80V y 100V) durante 30 μ seg en intervalos de 100 mseg. Los embriones que fueron visualizados como una única blastómera media hora después fueron considerados fusionados. Se evaluó el desarrollo hasta estadio de blastocisto en el día 8. Embriones no fusionados fueron usados como control.

Intensidad del campo (V)	Nro. de embriones de 2 células tratados	Nro. de embriones fusionados (%)	Nro. de blastocistos obtenidos (%)
100	43	35 (81)bdf	4 (11)a
80	61	58 (95)bdf	12 (21)a
60	56	45 (80)bd	14 (31)b
40	78	60 (77)bc	29 (48)
20	31	5 (16)a	0 (0)
Control	93	ND	44 (47)

(a,b,c,d,f): Valores con diferentes letras en la misma columna difieren estadísticamente ($P < 0,05$).

6.5.2. Determinación de ploidía de los embriones fusionados en estadio de 2 células

Se analizaron los extendidos de embriones fusionados en los días 1 y 2 post-fusión. Como era de esperar, el procedimiento de fusión indujo una mayor proporción de embriones triploides (2/28, 7%) y tetraploides (4/28, 14%) que la observada para el grupo control (0/40, 0% en ambos casos). Las tasas de embriones aneuploides también fueron altas tanto en el grupo de embriones fusionados como en el grupo control (8/28, 27% para los F y 9/40, 22% para el control de FIV). Dos observaciones interesantes de este experimento fueron que el control de FIV mostró una alta tasa de blastómeras haploides (16/40, 40%) y, a su vez, se observó una mayor tasa de producción de embriones diploides para el grupo F, en comparación con el control de FIV (10/28, 36% frente a 8/40, 20%; respectivamente).

6.5.3. Agregación sincrónica (S) y asincrónica (AS) de embriones fusionados (F) o no fusionados (NF) con blastómeras expresando *egfp* y localización de la expresión del transgén

Los resultados de la Tabla 13 muestran el desarrollo hasta el estadio de blastocisto y la localización de la expresión de *egfp* en los embriones generados por la agregación de una blastómera de un embrión en estadio de 8 células con uno o dos embriones de FIV, fusionados (F) o no fusionados (NF) en forma sincrónica (S) o asincrónica (AS). Se observó la formación de blastocistos en los ocho grupos experimentales. Los grupos 2SF, 2SNF, 2ASF y 2ASNF mostraron tasas de blastocistos significativamente más altas que los grupos 1SF, 1SNF, 1ASF y 1ASNF (Tabla 13). Además, se evaluó la expresión y la localización de *egfp* en los blastocistos quiméricos. De acuerdo con la expresión de *egfp*, los grupos asincrónicos mostraron un mayor número de blastocitos que expresaban la proteína EGFP que los demás grupos ($P < 0,05$). En cuanto a la localización de la expresión de EGFP en el MCI, se observó la mayor localización para el grupo 2ASF (6/13, 46% de los blastocistos expresaban el transgén en el MCI; Figura 17). A pesar de que los grupos 1SF y 2SF presentaron altas tasas de expresión localizada (1/1, 100% y 1/2, 50%, respectivamente), no integraron eficientemente la blastómera *egfp*, ya que una proporción muy baja de los blastocistos obtenidos exhibió expresión generalizada de *egfp* (1/11 blastocistos, 9% y 2/22, 9%, respectivamente). Los grupos 2ASF y 2ASNF mostraron tasas muy altas de expresión generalizada de *egfp* en diferentes áreas de los blastocistos quiméricos, siempre incluyendo el MCI (7/13, 54% y 7/9, 78%, respectivamente). En algunos casos, el grupo 2SNF formó dos blastocistos independientes o dos trofoblastos conectados por un único MCI, sin la integración de la blastómera transgénica.

Tabla 13. Agregación embrionaria para la generación de quimeras transitorias.

Evaluación de las tasas de blastocistos y la localización de la expresión del transgén en embriones producidos por agregación de una blastómera *egfp* con embriones en fusionados en estadio de 2 células (F) o no fusionados (NF), sincrónica o asincrónicamente.

Sincronicidad	Nro. de embriones agregados	Tipo de embrión agregado	n	Nro. de blastocistos (%*)	Total de blastocistos EGFP (%**)	Blastocistos con EGFP localizada (%***)	Blastocistos con EGFP generalizada (%***)
Asincrónico	1	F	67	14 (21)a	3 (21)a	1 (33)	2 (67)
		NF	75	9 (12)a	1 (11)a	0 (0)	1 (100)
	2	F	75	27 (36)b	13 (48)a	6 (46)	7 (54)
		NF	75	22 (29)b	9 (41)a	2 (22)	7 (78)
Sincrónico	1	F	52	11 (21)a	1 (9)b	1 (100)	0 (0)
		NF	64	13 (20)a	1 (8)b	0 (0)	1 (100)
	2	F	64	22 (34)b	2 (9)b	1 (50)	1 (50)
		NF	75	31 (41)b	3 (10)b	0 (0)	3 (100)

(a,b): Valores con diferentes letras en la misma columna difieren estadísticamente ($P < 0,05$).

(%*) Porcentajes respecto del número de embriones agregados, n; (%**) Porcentajes respecto del número de blastocistos obtenidos; (%***) Porcentajes respecto del número de blastocistos EGFP totales.

6.6. DISCUSIÓN

Se evaluaron las condiciones para producir embriones bovinos por complementación trofoblástica de blastómeras de alto valor genético (que den lugar a todos los tejidos embrionarios), con embriones fusionados de bajo valor, que se esperó produzcan sólo los tejidos extraembrionarios. Para ello, fueron desarrollados varios experimentos tanto para producir embriones fusionados como para complementar estos embriones a una blastómera de interés. Para este trabajo, se emplearon blastómeras expresando el transgén *egfp*, con el fin de conseguir visualizar y localizar su contribución final en el embrión (expresión localizada únicamente en el MCI o generalizada por todo el blastocisto). Esta estrategia podría tener un gran impacto en la generación de embriones de alto valor y en la producción de embriones a partir de CME e iPSc.

En el primer experimento, se intentó determinar las mejores condiciones para generar embriones bovinos tetraploides/aneuploides por electrofusión. Con este objetivo, embriones de FIV en estadio de 2 células fueron fusionados en el día 1 de desarrollo, aplicando diferentes pulsos. Los embriones fusionados fueron aquellos que se visualizaron como una única blastómera una hora después de aplicado el impulso. En todos los casos (excepto en el grupo de 20V), los embriones fusionados desarrollaron hasta estadio de blastocistos. Debido a que la tasa más alta de desarrollo hasta blastocistos fue generada con 40V, se escogió esa tensión como la mejor condición para la producción de embriones fusionados. Este resultado es consistente con lo publicado recientemente en ratones por Suo y col. (2009), donde la mejor condición para generar embriones tetraploides a partir de embriones murinos en estadio de 2 células resultó en un campo eléctrico de 0,8 kV/cm, equivalente a nuestras condiciones (Suo y col., 2009). Otros investigadores también han producido embriones tetraploides en bovinos por electrofusión (Curnow y col., 2000; Iwasaki y col., 1999). Sin embargo, sus condiciones y los resultados obtenidos fueron muy diferentes a los nuestros.

En el segundo experimento, un subconjunto de embriones electrofusionados a 40V fue sometido a evaluación de su contenido cromosómico en el momento de la agregación

(estadio de 2 a 8 células). Esta evaluación confirmó que estos embriones fusionados muestran un aumento de la proporción de anomalías cromosómicas que pueden favorecer que esas células sean rechazadas del MCI por blastómeras diploides normales (Slimane y col., 2000). En nuestro estudio, la incidencia global de anomalías cromosómicas fue alta en ambos grupos F y NF (control). Las altas tasas de embriones haploides (40%) en el grupo control de FIV podrían explicarse por el hecho de que las aberraciones cromosómicas ocurren en alta proporción en los estadios tempranos de los embriones producidos por FIV, pero se corrigen en el curso de su desarrollo, como ha sido sugerido previamente por otros autores (Slimane y col., 2000; Angell y col., 1983; Santalo y col., 1986; Viuff y col., 2000). La tasa de embriones mixoploides también es muy alta en las primeras etapas de desarrollo, pero tiene menor importancia para el establecimiento de la preñez (Schmidt y col., 1996). Por otro lado, en un estudio previo de Curnow y col. (2000), se informó una alta incidencia (41,7%) de mosaicismo entre células diploides y tetraploides de los blastocistos bovinos generados por electrofusión. Este grupo sugirió que la división asincrónica y estado nuclear de las blastómeras son los factores responsables del mosaicismo (Curnow y col., 2000). Esta información concuerda con nuestra observación de que el grupo F resultó en mayores tasas de triploidía (7,14%) y tetraploidía (14,29%) que el control NF (0% en ambos casos). Estos factores podrían ser la razón por la cual las células con anomalías cromosómicas son rechazadas por las blastómeras diploides normales expresando el transgén para evitar su participación en el MCI. De la misma manera, Curnow y col. obtuvieron tasas bajas (12,5%) de embriones verdaderamente tetraploides (Curnow y col., 2000). Aún está en controversia si solo las células tetraploides o algunas células aneuploides pueden ser asignadas al trofoblasto. Por esa razón, a pesar de haber obtenido tasas de embriones tetraploides más bajas de lo esperado, se evaluó la agregación embrionaria con embriones fusionados en estadio de 2 células.

En el último experimento, se testearon tanto la complementación sincrónica como asincrónica. El mayor número de blastocistos fue obtenido cuando dos embriones sincrónicos y no fusionados (grupo 2SNF) fueron colocados juntos con una blastómera expresando EGFP (31/75; 41%); sin embargo, ningún embrión en este grupo mostró expresión localizada de EGFP en el MCI. Planteamos la hipótesis de que esta observación

es debido al desequilibrio en el número de células entre embriones sincrónicos más avanzados (en estadio de 16 o más de 16 células) y solo una blastómera EGFP más joven y más grande, proveniente de un embrión de 8 células. Por otro lado, dos embriones asincrónicos de FIV (2AS) fueron la mejor condición para complementar la blastómera que expresaba el transgén y para dirigir la expresión de EGFP al MCI de la quimera final. Los grupos 2ASF y 2ASNF mostraron entre 40 y 50% de quimerismo, fácilmente detectado mediante la visualización de la expresión de la proteína EGFP en los blastocistos obtenidos. La complementación AS es una técnica desarrolladas en ratones. En 1978 se informó por primera vez en murinos que la asincronía entre las células en un embrión intacto indica que la primera célula en dividirse al estadio de 8 células tiende a contribuir mucho más al MCI, en comparación con la última célula que se divide hacia esa etapa (Kelly y col., 1978). Más tarde, se informó que en la complementación, los embriones en etapa más temprana tienen más posibilidades de contribuir al MCI que los embriones de edad más avanzada y que la posición de las blastómeras es un factor clave para mejorar la generación de los embriones quiméricos, así como el estadio de asincronía entre las partes que están siendo agregadas (Spindle y col., 1982). Nuestros resultados confirmaron la hipótesis de que los embriones agregados más jóvenes complementan mejor a blastómeras de edad más avanzada, comparado con embriones en el mismo o en un estado más avanzado de desarrollo que esa célula y favoreciendo la localización en el MCI de las células hijas provenientes de la blastómera de interés. En particular, el grupo 2ASF resultó en una mayor complementación y orientación de la blastómera en el MCI (Figura 17). En este caso, los embriones fecundados *in vitro* fueron más jóvenes que las blastómeras expresando EGFP. En quimeras de ratón se ha comprobado que las células tetraploides son excluidas del feto, incluso cuando estas células predominan inicialmente, y que las células diploides normales contribuyen mejor tanto al MCI como a los tejidos extraembrionarios (Tarkowsky y col., 2005). El grupo 2ASNF también dio lugar a altas tasas de complementación; sin embargo, las células que expresaban el transgén se localizaron en diferentes partes de la quimera final, incluyendo siempre el MCI. Esto demuestra que este grupo también es una buena alternativa para producir embriones quiméricos, pero sin una localización específica de la blastómera de interés. Algunos investigadores también han analizado arreglos espaciales

para la generación de embriones quiméricos (Hillman y col., 1972; Kelly y col., 1978; Tarkowsky y col., 2005). Este aspecto no ha sido evaluado en nuestro trabajo.

Simultáneamente, nuestros resultados indican que el sistema WOW es eficiente para sostener altas tasas de producción de blastocistos en todos los grupos, especialmente cuando dos embriones de FIV (en cualquier condición de sincronía evaluada) se colocan juntos en un micropozo. Las altas tasas de blastocistos observadas después de la agregación de embriones coinciden con estudios de transferencia nuclear de célula somática (clonación) anteriormente desarrollados en nuestro laboratorio (Gambini y col., 2012) y en otras condiciones (Boiani y col., 2003; Ribeiro y col.; 2009), que también han demostrado que la agregación inicial de embriones mejora las tasas de desarrollo hasta estadio de blastocito. Un mayor número de clones bovinos agregados refuerza la división celular, las tasas de blastocistos y el número de células por embrión (Ribeiro y col., 2009; Zhou y col., 2008), como también mejora las tasas de preñeces tempranas de animales clonados (Pedersen y col., 2005). En este trabajo, se utilizaron embriones fecundados *in vitro* y, por tal motivo, los efectos positivos de la agregación de embriones se deberían más a un aumento en el número de células del embrión en los primeros días de desarrollo, que a una compensación epigenética observada en los embriones clonados. Informes anteriores han demostrado que el número inicial de células influye en el desarrollo del embrión (Westhusin y col., 1996; Tagawa y col., 2008), ya que técnicas como el aislamiento de blastómeras resultan en una reducción de la calidad y el desarrollo embrionario.

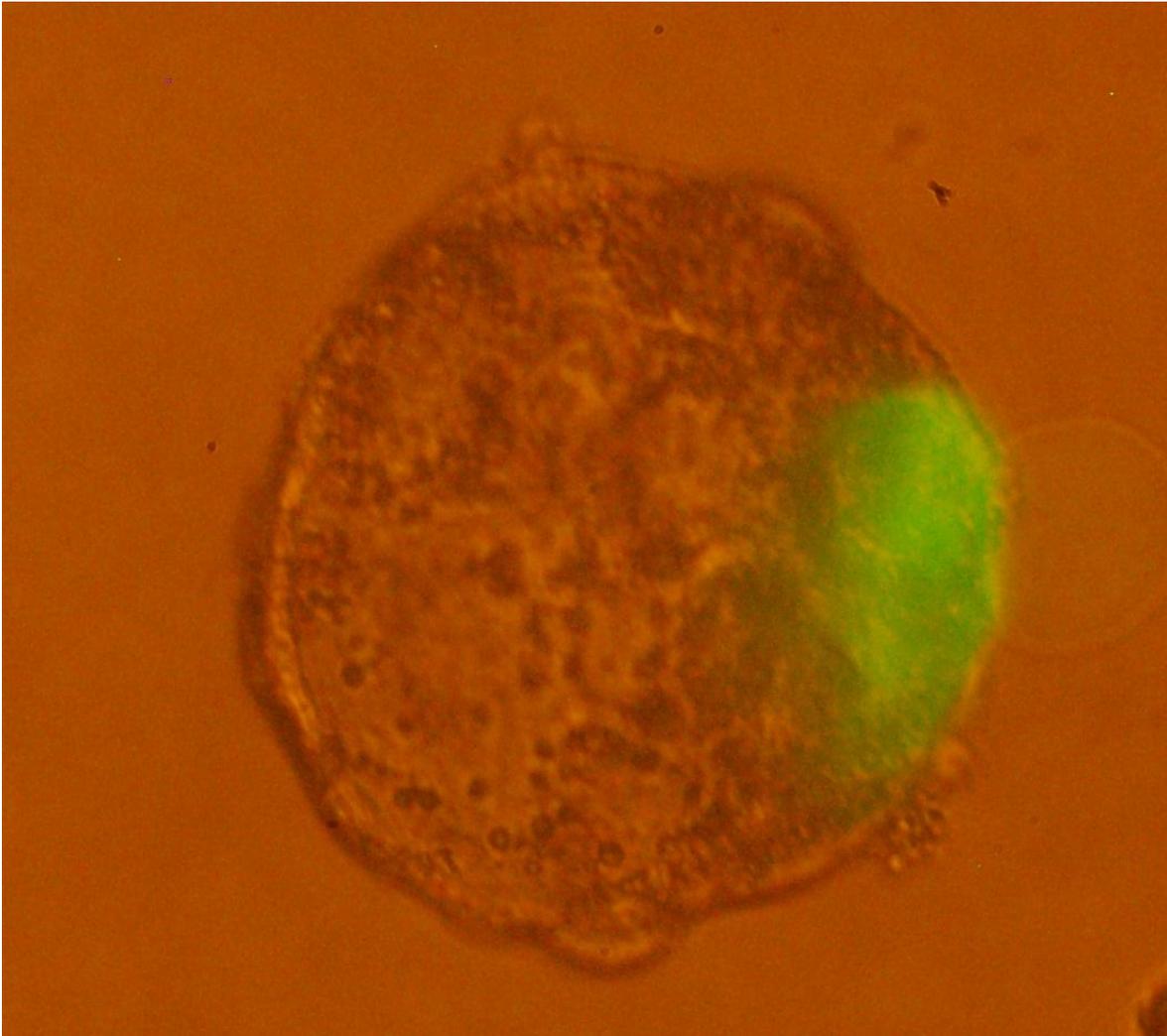


Figura 17. Blastocisto producido en el grupo 2ASF, con expresión de EGFP localizada. El mayor número de blastocistos expresando la proteína EGFP en el MCI (verde fluorescente) fue obtenido cuando 2 embriones fusionados y asincrónicos (2ASF) fueron agregados con la blastómera expresando EGFP. Los embriones fueron visualizados bajo luz azul, empleando un filtro de excitación a 488 nm y un filtro de emisión a 530 nm.

Una observación final importante de este tercer experimento es que hemos empleado blastómeras que expresaban EGFP derivadas de embriones bovinos de FIV en estadio de 8 células. En esta etapa del desarrollo embrionario de la especie bovina ocurre la transición materno-embionaria, con activación del genoma embrionario bovino (AGE) (Crosby y col., 1988; Frei y col., 1989); por esta razón la expresión del transgén no había comenzado en todas las blastómeras y por eso fue imposible determinar la cantidad de blastocitos que podrían producirse a partir de un único embrión en estadio de 8 células. En este trabajo, las blastómeras que expresaban *egfp* fueron producidas por la técnica de vesículas coincubadas con pCX-EGFP. La principal ventaja de este procedimiento es la posibilidad de producir embriones de FIV que expresen el transgén, con un mayor potencial de desarrollo que los embriones clonados (Ikawa y col., 1995). Sin embargo, como con la mayoría de las técnicas de transgénesis disponibles, el mosaicismo resulta debido a la integración del transgén después de la primera división mitótica (Perry y col., 1999). El objetivo de este trabajo fue utilizar las blastómeras que expresaban *egfp* para identificar el linaje celular y analizar la complementación embrionaria en bovinos. Los futuros trabajos deberán comprobar la eficiencia de esta técnica en términos de producción de blastocistos por cada embrión desagregado. La complementación de células y la agregación de embriones proporcionan un método no solo para multiplicar el número inicial de embriones, sino también para reducir o revertir mosaicismo, dirigiendo la expresión del transgén al MCI.

CAPÍTULO VII.

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

7.1. CONCLUSIONES GENERALES

El trabajo realizado durante el desarrollo de esta Tesis logra comprobar nuestra hipótesis, dado que los experimentos demuestran que es posible generar embriones a partir de una única blastómera individual en estadio de 8 células. Para lograr este objetivo, se emplearon embriones con células aneuploides y asincrónicas que soportaron y favorecieron el desarrollo embrionario de la blastómera de interés y, posiblemente, contribuirán al reconocimiento de la preñez tras su transferencia. De esta manera, producimos exitosamente quimeras transitorias, donde la blastómera individual origina el MCI (y por ende el feto); mientras que la placenta, que se eliminará en el momento del nacimiento, provendrá de los embriones de soporte que solo contribuyeron al desarrollo temprano. Por este motivo se podrán utilizar animales de mérito genético para generar las blastómeras individuales y de bajo mérito para producir los embriones de soporte.

Para alcanzar este fin, fue necesario desarrollar un sistema altamente eficiente de FIV. En el Capítulo II se corroboró, como ha sido reportado previamente, que para la FIV existen diferencias en los resultados cuando se usa semen proveniente de diferentes toros. Sin embargo, una vez seleccionado el macho, la PIV logra alcanzar tasas de desarrollo *in vitro* sumamente altas. También fue posible obtener altas tasas de blastocistos de excelente calidad, combinando los procedimientos de OPU y FIV.

En el Capítulo III, el semen sexado también produjo diferencias significativas en el desarrollo embrionario a partir de partidas de distintos toros, ya sea en condiciones *in vitro* como *in vivo*. A pesar de esto, fue posible obtener altas tasas de producción de embriones *in vitro* mediante el empleo de semen sexado hembra y un protocolo corto (5h) de FIV, aumentando el rendimiento respecto de la IA. La variabilidad que presentan las pajuelas de semen sexado de toros empleados *in vitro* podría estabilizarse tras el desarrollo de un perfil de agente capacitante para cada toro, donde se determina la concentración necesaria de

heparina para capacitar los espermatozoides de manera eficiente. Sin embargo, la práctica de estas pruebas excedió los objetivos de esta Tesis.

En el Capítulo IV se desarrolló un sistema de criopreservación de embriones para que simplifique el uso de todas las técnicas y procedimientos con ZP y LZP, llevadas en cabo en los siguientes capítulos. Si bien ha sido reportado que los embriones producidos *in vitro* toleran mejor su criopreservación a través de la vitrificación, existen pocos reportes de conservación de embriones LZP. En este sentido, conseguimos demostrar que las tasas de desarrollo son semejantes a los embriones convencionales con ZP, observación que resulta tanto alentadora como innovadora.

La tecnología de la transferencia de ooplasmas ha sido empleada en trabajos de reproducción humana, principalmente para sostener el desarrollo de oocitos comprometidos. Estas experiencias han permitido el nacimiento exitoso de los embriones producidos, aparentemente sin complicaciones debido a la heteroplasma generada. En el Capítulo V, se estudió la transferencia de ooplastos (TO) con el objetivo de producir embriones con mayor competencia en el desarrollo, cuyas blastómeras individuales sean capaces de sustentar mejor su desarrollo individual. Las experiencias determinaron el efecto contrario. El desarrollo de los embriones de mayor tamaño se vio comprometido, reduciendo significativamente las tasas de producción de blastocistos. Esto indica que un exceso de citoplasma resulta dañino, posiblemente por el aumento en la relación superficie/volumen para el intercambio de nutrientes o bien por el aumento de las combinaciones de embriones y ooplastos comprometidos. El mismo comportamiento fue observado en el caso del cultivo de las blastómeras individuales generadas a partir de los embriones experimentales de TO, perjudicando su desarrollo individual e imposibilitando la multiplicación embrionaria por esta vía.

En el Capítulo VI, dado que no fue posible aumentar la competencia de las blastómeras individuales post-desagregación de embriones en estadio de 8 células, la generación de quimeras transitorias fue analizada como una alternativa. En conclusión, este estudio demostró que la complementación asincrónica con dos embriones fusionados

genera el mejor resultado de agregación. En este sentido, el término transitorio se refiere a la generación de tipos celulares que actúen como trofoblastos, sustentando el desarrollo embrionario temprano. Posteriormente, el trofoblasto dará origen a los tejidos extraembrionarios, colaborando en el establecimiento de la preñez y la comunicación materno-fetal a través de la formación de la placenta. El MCI del embrión generado corresponde a las células de interés que se desean multiplicar. Por lo tanto, el trofoblasto temporario no formaría parte de los tejidos embrionarios y se eliminaría luego del parto. Esta técnica podrá tener gran aplicación tanto para la multiplicación de embriones de alto valor genético como para la reversión del mosaicismo de embriones transgénicos producidos por una técnica relativamente simple como la FIV. También tendrá gran impacto para la clonación de individuos a partir de CM e iPSc.

Por todo lo expuesto, los resultados presentados en los diferentes capítulos de esta Tesis conforman una base sólida en el conocimiento del desarrollo embrionario de bovinos. Se produjeron embriones LZP con competencia semejante a la de los embriones convencionales, incluso respecto de su resistencia a la criopreservación; y se logró establecer una técnica simple de clonación embrionaria.

7.2. PERSPECTIVAS

Los resultados presentados en esta Tesis demostraron que las distintas técnicas evaluadas son eficientes para producir embriones bovinos, tanto con ZP como LZP. Las tecnologías introducidas abren las puertas al diseño de nuevas estrategias de multiplicación de embriones bovinos, como también para el desarrollo de actividades comerciales en reproducción bovina.

- Dado que los resultados de FIV empleando el semen de los toros testeados concluye en resultados de producción de embriones *in vitro* y tasas de preñeces sumamente altas, el estudio de FIV para la optimización del empleo de machos resulta una ventana abierta para su exploración. Realizar perfiles individuales de agentes capacitantes en toros cuyo procedimiento de FIV estándar no funcionan, permitiría emplear la FIV con semen de cualquier toro de interés.
- En este mismo sentido, desagregar embriones sexados en estadio de 2 células podría resultar en mayores tasas de producción de embriones. Las alternativas en torno de este punto serían la transferencia individual de los embriones producidos por desagregación o bien la transferencia conjunta, aumentando las chances de generar preñeces. Al tratarse de embriones del mismo sexo, también se estarían evitando problemas relacionados al *freemartinismo* en el caso de preñeces múltiples.
- Respecto del uso de semen sexado, resulta interesante la generación de un convenio con empresas de sexado, para poder bajar los costos para su uso en actividades científicas. Actualmente la mayoría del semen usado comercialmente en Argentina corresponde a partidas provenientes de Estados Unidos y Canadá. El mayor inconveniente reside en la baja disponibilidad de semen. Es decir, las partidas que llegan a nuestro país van variando en el tiempo y no existe libre decisión para la elección del macho. Asimismo, comenzar a aplicar protocolos de sexado de semen de pajuelas previamente congeladas podría aumentar la disponibilidad.
- Existe consenso respecto de la relación directa entre la sobrevivencia de los embriones de PIV criopreservados y las condiciones y los medios de cultivo. Si bien en esta

Tesis se presentaron análisis preliminares, los resultados resultan alentadores. Varios aspectos queda por optimizar respecto de la vitrificación. Comparar distintos estadios embrionarios, realizar análisis metabólicos y transferencias embrionarias son los principales pasos a seguir.

- En las condiciones estudiadas, la TO perjudicó el desarrollo embrionario. Se requieren experimentos adicionales para identificar las causas de estos resultados obtenidos, en términos de patrón transcripcional, establecimiento de preñez y sobrevivencia post-vitrificación. Asimismo, es interesante evaluar el descenso en los niveles de MPF en los oocitos maduros enucleados y sometidos a un pulso eléctrico de fusión y si el mismo es suficiente para no diluir los factores espermáticos en el presunto cigoto. En el mismo sentido, trabajar en base a la cinética de desarrollo diferencial de los embriones transferidos con uno (grupo 1+) o dos ooplastos (2+) en el momento de realizar la desagregación de las blastómeras individuales podría incrementar los resultados obtenidos actualmente.
- Las quimeras transitorias exitosamente generadas durante el desarrollo de esta Tesis, deben ser confirmadas *in vivo*, analizando el establecimiento y mantenimiento de preñeces y estudiando las crías obtenidas. Realizar el procedimiento evitando el uso de células transgénicas facilitaría la experiencia. Asimismo, la combinación de células provenientes de animales *Bos taurus* y *Bos indicus* sería una alternativa para el posterior análisis.
- La clonación embrionaria también permitiría producir animales transgénicos con características zootécnicas superiores o productores de biofármacos; reduciendo los problemas de pérdidas embrionarias y fetales de la clonación reproductiva. Asimismo, dado que aún no ha sido posible realizar el establecimiento de CME o iPSc en bovinos, contar previamente con los trofoblastos para poder comprobar su totipotencialidad representa un gran avance en este sentido.

- Dado que se ha generado una nueva forma, original y no descrita previamente, de clonación embrionaria del ganado bovino, resulta necesaria la determinación del momento de la pérdida de pluripotencialidad en las blastómeras bovinas. Si bien cada una de las 4 blastómeras de un embrión bovino de 4 células es capaz de generar descendencia, resulta de gran interés explorar la posibilidad de mantener el estado de pluripotencialidad en blastómeras más avanzadas en su desarrollo para obtener un mayor número de crías idénticas.

Las expectativas futuras resultan alentadoras y, en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires contamos con todas las herramientas, tanto de equipamiento como de personal altamente capacitado, para poder llevarlas a cabo en el corto plazo.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H (2002). Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol. Reprod. Dev.*; 61(1):57-66.
- Alberio R, Zakhartchenko V, Motlik J, Wolf E (2001). Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. *Int. J. Development Biology*; 45:797-809.
- Aller JF, Alberio RH, Palma GA (2000). Gestation with in vitro produced embryos from oocytes of ovariectomized cows. *Arch.Med.Vet.*; 1:33-39.
- Aller JF, Mucci NC, Kaiser GG, Callejas SS, Alberio RH (2012). Effect of repeated eCG treatments and ovum pick-up on ovarian response and oocyte recovery during early pregnancy in suckling beef cows. *Anim. Reprod. Sci.*; 133(1-2):10-15.
- Amarnath D, Choi I, Moawad AR, Wakayama T, Campbell KH (2011). Nuclear-cytoplasmic incompatibility and inefficient development of pig-mouse cytoplasmic hybrid embryos. *Reproduction*; 142(2):295-307.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*; 290:457-465.
- Angell RR, Aitken RJ, Van Look PFA, Lunsden MA, Templeton AA (1983). Chromosome abnormalities in human embryo after in vitro fertilization. *Nature*; 303:336-338.
- Aoyagi Y, Fujii K, Iwazumi Y, Furudate M, Fukui Y, Ono H (1988). Effects of two treatments on semen from different bulls on in vitro fertilization results of bovine oocytes. *Theriogenology*; 30:973-985.
- Aparicio IM, Garcia-Herreros M, O'Shea LC, Hensey C, Lonergan P, Fair T (2011). Expression, regulation, and function of progesterone receptors in bovine cumulus oocyte complexes during in vitro maturation. *Biol Reprod*; 84:910-921.
- Argov N, Arav A, Sklan D (2004) Number of oocytes obtained from cows by OPU in early, but not late lactation increased with plasma insulin and estradiol concentrations and expression of mRNA of the FSH receptor in granulosa cells. *Theriogenology*; 61(5):947-962.

- Attardi G, Chomyn A, Doolittle RF, Mariottini P, Ragan CI (1986). Seven unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode subunits of the respiratory chain NADH dehydrogenase. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* LI:103-114.
- Barceló-Fimbres M, Campos-Chillón LF, Seidel GE Jr (2011). In vitro fertilization using non-sexed and sexed bovine sperm: sperm concentration, sorter pressure, and bull effects. *Reprod. Domest. Anim.*; 46(3):495-502.
- Barceló-Fimbres M, Seidel GE Jr (2007). Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid accumulation in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*; 74(11):1406-1418.
- Barritt J, Willadsen S, Brenner C, Cohen J (2001a). Cytoplasmic transfer in assisted reproduction. *Hum. Reprod. Update*; 7(4):428-435.
- Barritt JA, Brenner CA, Malter HE, Cohen J (2001b). Mitochondria in human offspring derived from ooplasmic transplantation. *Hum. Reprod.*; 16(3):513-516.
- Baruselli PS, Sá Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MFG, Barros CM, Bó GA (2006). Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*; 65:77-88.
- Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR (1996). Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod.*; 11(10):2217-2222.
- Bavister B, Yanagimachi R (1977). The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.*; 16:228-237.
- Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Spencer TE, Wu G (2008). Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. *Reprod. Biol.*; 8:179-211.
- Bech-Sàbat G, García-Ispuerto I, Yániz J, López-Gatius F (2010). Therapeutic approaches to pregnancy loss of non-infectious cause during the late embryonic/early foetal period in dairy cattle. A review. *Reprod. Domest. Anim.*; 45(6):e469-75.
- Beddington RSP, Robertson EJ (1989). An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development*; 105:733-737.

- Betteridge KJ, Smith C, Stubbings RB, Xu KP, King WA (1989). Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal embryos in vitro. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*; 38:87-98.
- Bevacqua RJ, Pereyra-Bonnet F, Olivera R, Hiriart MI, Sipowicz P, Fernandez-Martín R, Radrizzani M, Salamone DF (2012). Production of IVF transgene-expressing bovine embryos using a novel strategy based on cell cycle inhibitors. *Theriogenology*; 78:57-68.
- Bevacqua RJ, Canel NG, Hiriart MI, Sipowicz P, Rozenblum GT, Vitullo A, Radrizzani M, Fernandez Martin R, Salamone DF (2013). Simple gene transfer technique based on I-SceI meganuclease and cytoplasmic injection in IVF bovine embryos. *Theriogenology*; 80(2):104-113.
- Bevacqua RJ, Pereyra-Bonnet F, Fernandez-Martin R, Salamone DF (2010). High rates of bovine blastocyst development after ICSI-mediated gene transfer assisted by chemical activation. *Theriogenology*; 74(6):922-931.
- Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T, Lutze-Wallace C (2000). Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology*; 40(2):110-116.
- Biggers JD (1986). The potential use of artificially produced monozygotic twins for comparative experiments. *Theriogenology*;26(1):1-25.
- Birky CW Jr (1995). Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: Mechanisms and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 92:11331-11338.
- Bitner-Glindzicz M (2002) Hereditary deafness and phenotyping in humans. *Br. Med. Bull.*; 63:73-94.
- Blässe AK, Oldenhof H, Ekhlasi-Hundrieser M, Wolkers WF, Sieme H, Bollwein H (2012). Osmotic tolerance and intracellular ion concentrations of bovine sperm are affected by cryopreservation. *Theriogenology*; 78(6):1312-1320.
- Blomberg L, Hashizume K, Viebahn C (2008). Blastocyst elongation, trophoblastic differentiation, and embryonic pattern formation. *Reproduction*; 135:181-195.
- Blondin P, Guilbault LA, Sirard MA (1997). The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. *Theriogenology*; 48(5):803-813.

- Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA (2002). Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol. Reprod.*; 66(1):38-43.
- Bó GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ (1995). Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*; 43:31-40.
- Bó GA, Baruselli PS, Chesta P, Martins CM (2006). The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*; 65:89-101.
- Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tríbulo R, Tríbulo H, Mapletoft RJ (2002). The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*; 57:53-72.
- Bó GA, Cutaia L, Peres LC, Pincinato D, Maraña D, Baruselli PS (2007). Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*;64:223-236.
- Boediono A, Suzuki T, Li LY, Godke RA (1999). Offspring born from chimeras reconstructed from parthenogenetic and in vitro fertilized bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*; 53(2):159-170.
- Boe-Hansen GB, Morris ID, Ersboll AK, Greve T, Christensen P (2005). DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. *Theriogenology*; 63:1789-1802.
- Boiani M, Eckardt S, Leu NA, Scholer HR, McLaughlin KJ (2003). Pluripotency deficit in clones overcome by clone-clone aggregation: epigenetic complementation? *EMBO J.*; 22:5304-5312.
- Boland MJ, Hazen JL, Nazor KL, Rodriguez AR, Gifford W, Martin G, Kupriyanov S, Baldwin KK (2009). Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature*; 461(7260):91-94.
- Booth PJ, Vajta G, Høj A, Holm P, Jacobsen H, Greve T, Callesen H (1999). Full-term development of nuclear transfer calves produced from open-pulled straw (OPS) vitrified cytoplasts: work in progress. *Theriogenology*; 51(5):999-1006.

- Bowles EJ, Tecirlioglu RT, French AJ, Holland MK, St John JC (2008). Mitochondrial DNA transmission and transcription after somatic cell fusion to one or more cytoplasts. *Stem Cells*; 26(3):775-782.
- Brackett BG, Bousquet D, Boic ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA (1982). Normal development following fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*; 27:147-158.
- Brackett BG, Oliphant G (1975). Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.*; 12:260-274.
- Braude PR, Pelha HRB, Flach G, Labotto R (1979). Post-transcriptional control in the early mouse embryo. *Nature*; 282:102-105.
- Buchanan BR, Seidel GE Jr, McCue PM, Schenk JL, Herickhoff LA, Squires EL (2000). Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. *Theriogenology*; 53(6):1333-1344.
- Burns DS, Jimenez-Krassel F, Ireland JL, Knight PG, Ireland JJ (2005). Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol. Reprod.*; 73(1):54-62.
- Campbell KHS, Alberio R (2003). Reprogramming the genome: Role of the cell cycle. *Reprod. Suppl.*; 61:477-494.
- Caraviello DZ, Weigel KA, Fricke PM, Wiltbank MC, Florent MJ, Cook NB, Nordlund KV, Zwald NR, Rawson CL (2006). Survey of management practices on reproductive performance of dairy cattle on large US commercial farms. *J. Dairy Sci.*; 89(12):4723-4735.
- Carter SB (1967). Effects of cytochalasin on mammalian cells. *Nature*; 213:261-264.
- Carvalho JO, Sartori R, Machado GM, Mourao GB, Dode MAN (2010). Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. *Theriogenology*; 74:1521-1530.
- Chan CC, Liu VW, Lau EY, Yeung WS, Ng EH, Ho PC (2005). Mitochondrial DNA content and 4977 bp deletion in unfertilized oocytes. *Mol. Hum. Reprod.*; 11(12):843-846.

- Chaubal SA, Ferre LB, Molina JA, Faber DC, Bols PE, Rezamand P, Tian X, Yang X (2007). Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. *Theriogenology*; 67(4):719-28.
- Cheong HT, Park KW, Im GS, Lai L, Sun QY, Day BN, Parther RS (2002). Effect of elevated Ca²⁺ concentration in fusion/activation medium on the fetal fibroblast nuclear transfer embryos. *Mol. Reprod. Dev.*; 61:488-492.
- Chiaratti MR, Bressan FF, Ferreira CR, Caetano AR, Smith LC, Vercesi AE, Meirelles FV (2010a). Embryo mitochondrial DNA depletion is reversed during early embryogenesis in cattle. *Biol. Reprod.*; 82(1):76-85.
- Chiaratti MR, Ferreira CR, Meirelles FV, Méo SC, Perecin F, Smith LC, Ferraz ML, de Sá Filho MF, Gimenes LU, Baruselli PS, Gasparini B, Garcia JM (2010b). Xenoplasmic transfer between buffalo and bovine enables development of homoplasmic offspring. *Cell. Reprogram.*; 12(3):231-236.
- Christensen P, Labouriau R, Birck A, Boe-Hansen GB, Pedersen J, Borchersen S (2011). Relationships among seminal quality measures and field fertility of young dairy bulls using low-dose inseminations. *J. Dairy. Sci.*; 94:1744-1754.
- Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Marh J, Lu SJ, Johnson J, Meisner L, Lanza R (2006). Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature*; 439:216-219.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de León FA, Robl JM (1998) Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*; 280:1256-1258.
- Cohen J, Scott R, Schimmel T, Levron J, Willadsen S (1997). Birth of infant after transfer of anucleate donor oocyte cytoplasm into recipient eggs. *Lancet*; 350:186-187.
- Cohen J, Scott R, Alikani M, Schimmel T, Munné S, Levron J, Wu L, Brenner C, Warner C, Willadsen S (1998). Ooplasmic transfer in mature human oocytes. *Mol. Hum. Reprod.*; 4(3):269-280.
- Collas P, Fissore R, Robl JM, Sullivan EJ, Barnes FL (1993). Electrically induced calcium elevation, activation, and parthenogenetic development of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*; 34:212-223.

- Comizzoli P, Marquant-Le Guienne B, Heyman Y, Renard JP (2000). Onset of the first S-phase is determined by a paternal effect during the G1-phase in bovine zygotes. *Biol. Reprod.*; 62:1677-1684.
- Cran DG, Johnson LA, Miller NG, Cochrane D, Polge C (1993). Production of bovine calves following separation of X- and Y- chromosome bearing sperm and in vitro fertilization. *Vet. Rec.*; 132:40-41.
- Crosby IM, Gandolfi, F, Moor RM (1988). Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J. Reprod. Fertil.*; 82(2):769-775.
- Crozet N, Dahirel M, Gall L (2000). Meiotic competence of in vitro grown goat oocytes. *J. Reprod. Fertil.*; 118(2):367-373.
- Cunningham JG (2005) *Fisiología Veterinaria*. Tercera edición, editorial Elsevier.
- Curnow EC, Gunn LM and Trounson AO (2000). Electroporation of two-cell bovine embryos for the production of tetraploid blastocysts in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*; 56:372-377.
- De La Torre-Sánchez JF, Gardner DK, Preis K, Gibbons J, Seidel GE Jr (2006b). Metabolic regulation of in vitro-produced bovine embryos. II. Effects of phenazine ethosulfate, sodium azide and 2,4-dinitrophenol during post-compaction development on glucose metabolism and lipid accumulation. *Reprod. Fertil. Dev.*; 18(5):597-607.
- De La Torre-Sánchez JF, Preis K, Seidel GE Jr (2006a). Metabolic regulation of in-vitro-produced bovine embryos. I. Effects of metabolic regulators at different glucose concentrations with embryos produced by semen from different bulls. *Reprod. Fertil. Dev.*; 18(5):585-596.
- De Souza Ribeiro E, Pereira da Costa Gerger R, Ohlweiler LU, Ortigari JrI, Mezzalira JC, Forell F, Bertolini LR, Rodrigues JL, Ambrósio CE, Miglino MA, Mezzalira A, Bertolini M (2009). *Cloning and Stem Cells*; 11(3): 377-386.
- Degrelle SA, Champion E, Cabau C, Piumi F, Reinaud P, Richard C, Renard JP, Hue I (2005). Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts. *Dev. Biol.*; 288:448-460.
- Demmers KJ, Derecka K, Flint A (2001). Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction*; 121:41-49.

- De Roover R, Feugang JM, Bols PE, Genicot G, Hanzen Ch (2008). Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle in vitro embryo production. *Reprod Domest Anim.*; 43(2):239-45.
- Dinnyés A, Nedambale TL (2009). Cryopreservation of manipulated embryos: tackling the double jeopardy. *Reprod. Fertil. Dev.*; 21(1):45-59.
- Dinnyés A, Dai Y, Jiang S, Yang X (2000). High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.*; 63(2):513-518.
- Dobrinsky JR (2002). Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*; 57(1):285-302.
- Donaldson L (1984). Cattle breed as a source of variation in embryo transfer. *Theriogenology*; 21:1013-1018.
- Driancourt MA (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*; 55(6):1211-1239.
- Duby RT, Damiani P, Looney CR, Fissore RA, Robl JM (1996). Prepubertal calves as oocyte donors: promises and problems. *Theriogenology*; 45:121-130.
- Duello TM, Byatt JC, Bremel RD (1986). Immunohistochemical localization of placental lactogen in binucleate cells of bovine placentomes. *Endocrinology*; 119(3):1351-1355.
- Edwards RG (2003). Aspects of the molecular regulation of early mammalian development. *Reprod. Biomed. Online*; 6:97-113.
- Eggan K, Akutsu H, Loring J, Jackson-Grusby L, Klemm M, Rideout WM 3rd, Yanagimachi R, Jaenisch R (2001). Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 98(11):6209-6214.
- El Shourbagy SH, Spikings EC, Freitas M, St John JC (2006). Mitochondria directly influence fertilisation outcome in the pig. *Reproduction*; 131(2):233-245.
- El-Sayed A, Hoelker M, Rings F, Salilew D, Jennen D, Tholen E, Sirard MA, Schellander K, Tesfaye D (2006). Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiol. Genomics*; 28: 84-96.
- Eppig JJ (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*; 122:829-838.

- Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola F, Hirao Y (1997) Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biol. Reprod.*; 56(4):976-984.
- Fabian D, Gjørret JO, Berthelot F, Martinat-Botté F, Maddox-Hyttel P (2005a). Ultrastructure and cell death of in vivo derived and vitrified porcine blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.*; 70(2):155-165.
- Fabian D, Koppel J, Maddox-Hyttel P (2005b). Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology*; 64(2):221-231.
- Fair T, Lonergan P, Dinnyés A, Cottell DC, Hyttel P, Ward FA, Boland MP (2001). Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. *Mol. Reprod. Dev.*; 58(2):186-195.
- Farin PW, Britt JH, Shaw DW, Slenning BD (1995). Agreement among evaluators of bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Theriogenology*; 44:339-349.
- Fehilly CB, Willadsen SM, Dain AR, Tucker EM (1985). Cytogenetic and blood group studies of sheep/goat chimaeras. *J.Reprod.Fert.*; 74:215-221.
- Fehilly CB, Willadsen SM, Tucker EM (1984b). Experimental chimaerism in sheep. *J. Reprod. Fertil.*; 70(1):347-351.
- Fehilly CB, Willadsen SM, Tucker EM. (1984a) Interspecific chimaerism between sheep and goat. *Nature*; 307(5952):634-636.
- Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, Herbert M (2002). Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum. Reprod.*; 17: 407-412.
- Fernandes P, Teixeira AB, Crocci AJ, Barros CM (2001). Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist, PGF2alpha and estradiol benzoate (EB). *Theriogenology*; 55(7):1521-1532.
- Fissore RA, Dobrinsky JR, Balise JJ, Duby RT, Robl J (1992). Patterns of intracellular Ca²⁺ concentrations in fertilised bovine eggs. *Biol. Reprod.*, 47:960-969.
- Folch J, Cocero MJ, Chesné P, Alabart JL, Domínguez V, Cognié Y, Roche A, Fernández-Arias A, Martí JI, Sánchez P, Echegoyen E, Beckers JF, Bonastre AS, Vignon X (2009). First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology*; 71(6):1026-1034.

- Fortune JE (2003). The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.*; 78:135–163.
- Frei RE, Schultz GA, Church RB (1989). Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16-cell stage of embryogenesis in the cow. *J. Reprod. Fertil.*; 86(2):637-641.
- Fry RC, Simpson TL, Squires TJ (1998). Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without FSH/GnRH. *Theriogenology*; 49; 1077-1082.
- Furusawa T, Ohkoshi K, Kimura K, Matsuyama S, Akagi S, Kaneda M, Ikeda M, Hosoe M, Kizaki K, Tokunaga T (2013). Characteristics of bovine inner cell mass-derived cell lines and their fate in chimeric conceptuses. *Biol. Reprod.*; 89(2):28.
- Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R, Lazzari G (2003). Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature*; 424(6949):635.
- Galvão KN, Sá Filho MF, Santos JE (2007) Reducing the interval from presynchronization to initiation of timed artificial insemination improves fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.*; 90(9):4212-4218.
- Gambini A, Jarazo J, Olivera R, Salamone DF (2012). Equine cloning: in vitro and in vivo development of aggregated embryos. *Biol. Reprod.*; 87(1):15,1-9.
- García A, Salaheddine M (1998). Effect of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology*; 50:575-585.
- Gibbons A, Cueto MI, Pereyra-Bonnet F (2011). A simple vitrification technique for sheep and goat embryo cryopreservation. *Small Ruminant Res.*; 95: 61-64.
- Gilbert SF, Sunderland (MA): *Developmental Biology*, Sexta edición, 2000.
- Golbus MS, Calarco PG, Epstein CJ (1973). The effects of inhibitors of RNA synthesis (amanitin and actinomycin D) on preimplantation mouse embryogenesis. *J. Exp. Zool.*; 186:207-216.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 77:7380-7384.

- Gossler A, Doetschman T, Korn R, Serfling E, Kemler R (1986). Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 3(23):9065-9069.
- Greenstein JS, Murray RW, Foley RC (1958). Observations on the morphogenesis and histochemistry of the bovine preattachment placenta between 16 and 33 days of gestation. *Anat. Rec.*; 132(3):321-341.
- Greising T, Jonas L (1999). The influence of enucleation on the ultrastructure of in vitro matured and enucleated cattle oocytes. *Theriogenology*; ;52(2):303-312.
- Guillomot M, Turbe A, Hue I, Renard JP (2004). Staging of ovine embryos and expression of the T-box genes Brachyury and Eomesodermin around gastrulation. *Reproduction*; 127:491-501.
- Han YM, Yamashina H, Koyama N, Lee KK, Fukui Y (1994). Effects of quality and developmental stage on the survival of IVF-derived bovine blastocysts cultured in vitro after freezing and thawing. *Theriogenology*; 42(4):645-654.
- Hansen PJ. Cellular and molecular basis of therapies to ameliorate effects of heat stress on embryonic development in cattle. *Anim. Reprod*; 2013. In press.
- Haskell RE, Bowen RA (1995). Efficient production of transgenic cattle by retroviral infection of early embryos. *Mol. Reprod. Dev.*; 40, 386-390.
- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, JIN ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA (1995). Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*; 43:141-152.
- Heyman Y (1985). Factors affecting the survival of whole and half embryos transferred in cattle. *Theriogenology*; 23:63-75.
- Hillman N, Sherman MI, Graham C (1972). The effect of spatial arrangement on cell determination during mouse development. *Embryol. Exp. Morph.*; 28:263-278.
- Hiriart MI, Bevacqua RJ, Canel NG, Fernández-Martín R, Salamone DF (2013). Production of chimeric embryos by aggregation of bovine egfp eight-cell stage blastomeres with two-cell fused and asynchronic embryos. *Theriogenology*;80(4):357-364.
- Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H (1999). High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented

- with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*; 52:683-700.
- Hoodbhoy T, Dean J (2004). Insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals. *Reproduction*; 127(4):417-422.
- Huang CC, Cheng TC, Chang HH, Chang CC, Chen CI, Liu J, Lee MS (1999). Birth after the injection of sperm and the cytoplasm of tripronucleate zygotes into metaphase II oocytes in patients with repeated implantation failure after assisted fertilization procedures. *Fertil. Steril.*; 72(4):702-706.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*; 47:23-32.
- Ikawa M, Kominami K, Yoshimura Y, Tanaka K, Nishimune Y, Okabe M (1995). A rapid and non-invasive selection of transgenic embryos before implantation using green fluorescent protein (GFP). *FEBS Lett.*; 375:125-128.
- Inaba Y, Aikawa Y, Hirai T, Hashiyada Y, Yamanouchi T, Misumi K, Ohtake M, Somfai T, Kobayashi S, Saito N, Matoba S, Konishi K, Imai K (2011). In-straw cryoprotectant dilution for bovine embryos vitrified using Cryotop. *J. Reprod. Dev.*; 57(4):437-443.
- Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith GW, Lonergan P, Evans ACO (2007). Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum. Reprod.*; 22:1687-1695.
- Iwasaki S, Campbell KH, Galli C, Akiyama K (2000). Production of live calves derived from embryonic stem-like cells aggregated with tetraploid embryos. *Biol. Reprod.*; 62(2):470-475.
- Iwasaki S, Ito Y, Iwasaki S (1999). In-vitro development of aggregates of bovine inner cell mass cells or bovine mammary cells and putative tetraploid embryos produced by electrofusion. *J. Reprod. Dev.*; 45(1):65-71.
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell*; 88(3):347-354.
- Januskauskas A, Johannisson A, Rodríguez-Martínez H (2001). Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology*; 55:947-961.

- Johnson LA (2000). Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim. Reprod. Sci.*; 60-61:93-107.
- Johnson LA, Flook JP, Look MV, Pinkel D (1987). Flow sorting of X and Y chromosome bearing into two populations. *Gamete Res.*; 16:1-9.
- Johnson WH, Loskutoff NM, Plante Y, Betteridge KJ (1995). Production of four identical calves by the separation of blastomeres from an in vitro derived four-cell embryo. *Vet. Rec.*; 137:15-16.
- Kang L, Wu T, Tao Y, Yuan Y, He J, Zhang Y, Luo T, Kou Z, Gao S (2011). Viable mice produced from three-factor induced pluripotent stem (iPS) cells through tetraploid complementation. *Cell Res.*; 21(3):546-549.
- Kasai M, Zhu SE, Pedro PB, Nakamura K, Sakurai T, Edashige K (1996). Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. *Cryobiology*;33(4):459-464.
- Kelly SJ, Mulnard JG, Graham CF (1978). Cell division and cell allocation in early mouse development. *Embryol. Exp. Morph.*; 48:37-51.
- Keltz MD, Skorupski JC, Bradley K, Stein D (2006). Predictors of embryo fragmentation and outcome after fragment removal in in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*; 86:321-324.
- Keskintepe L, Brackett BG (1996). In vitro developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol. Reprod.*; 55:333-339.
- King AM (2006). Development, advances and applications of diagnostic ultrasound in animals. *Vet. J.*; 171:408-420.
- Knobill E & Neill JD: *The Physiology of Reproduction*, volúmen 1. Editorial Raven Press, 1994.
- Kragh PM, Du Y, Corydon TJ, Purup S, Bolund L, Vajta G (2005). Efficient in vitro production of porcine blastocysts by handmade cloning with a combined electrical and chemical activation. *Theriogenology*; 64:1536-1545.
- Kruip TA, Pieterse MC, van Beneden TH, Vos PL, Wurth YA, Taverne MA (1991). A new method for bovine production: a potential alternative to superovulation. *Vet. Rec.*; 128(9):208-10.

- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP (2005). Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod. Biomed. Online.*; 11(3):300-388.
- Lagutina I, Fulka H, Lazzari G, Galli C (2013). Interspecies somatic cell nuclear transfer: advancements and problems. *Cell Reprogram*; [Epub ahead of print]
- Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK (1999). Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil. Steril.*; 72(6):1073-1078.
- Ledgard AM, Lee RS, Peterson AJ (2006). Expression of genes associated with allantois emergence in ovine and bovine conceptuses. *Mol. Reprod. Dev.*; 73:1084-1093.
- Leibfried L, First NL (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J. Anim. Sci.*; 48:76-86.
- Leibo SP, Loskutoff NM (1993). Cryobiology of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology*, 39:81-94.
- Li W, Zhao XY, Wan HF, Zhang Y, Liu L, Lv Z, Wang XJ, Wang L, Zhou Q (2011). iPS cells generated without c-Myc have active Dlk1-Dio3 region and are capable of producing full-term mice through tetraploid complementation. *Cell Res.*; 21(3):550-553.
- Li X, Yu Y, Wei W, Yong J, Yang J, You J, Xiong X, Qing T, Deng H (2005). Simple and efficient production of mice derived from embryonic stem cells aggregated with tetraploid embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 2005; 71(2):154-158.
- Liu J, Wang Y, Su J, Luo Y, Quan F, Zhang Y (2013). Nuclear donor cell lines considerably influence cloning efficiency and the incidence of large offspring syndrome in bovine somatic cell nuclear transfer. *Reprod. Domest. Anim.*; 48(4):660-664.
- Liu L, Keefe DL (2000). Cytoplasm mediates both development and oxidation-induced apoptotic cell death in mouse zygotes. *Biol. Reprod.*; 62(6):1828-1834.
- Liu L, Yang X. (1999) Interplay of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase inactivation during metaphase-to-interphase transition of activated bovine oocytes. *Biol. Reprod.*; 61(1):1-7.

- Lopes AS, Martinussen T, Greve T, Callesen H (2006). Effect of days post-partum, breed and ovum pick-up scheme on bovine oocyte recovery and embryo development. *Reprod. Domest. Anim.*; 41:196-203.
- López-Gatius F (2000). Site of semen deposition in cattle: a review. *Theriogenology*; 53:1407-1414.
- Loskutoff NM, Johnson WH, Betteridge KJ (1993). The developmental competence of bovine embryos with reduced cell numbers. *Theriogenology*; 39:95-107.
- Lu KH, Seidel Jr GE (2004). Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocysts development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. *Theriogenology*; 62:819-830.
- Lu TY, Market CL (1980). Manufacture of diploid/tetraploid chimeric mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 77:6012-6016.
- Lundy T, Smith P, O'Connell A, Hudson NL, McNatty KP (1999). Populations of granulosa cells in small follicles of sheep. *J. Reprod. Fertil.*; 115:251-262.
- Macháty Z, Páldi A, Csáki T, Varga Z, Kiss I, Bárándi Z, Vajta G (1993). Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.*; 98(2):467-470.
- Madoz LV, Giuliadori MJ, Migliorisi AL, Jaureguiberry M, de la Sota (2014). Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.*; 97(1):195-201.
- Mapletoft RJ, Hasler JF (2005). Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.*; 24:393-403.
- Martino A, Songsasen N, Leibo SP (1996). Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.*; 54(5):1059-1069.
- Massip A (2001). Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod. Domest. Anim.*; 36(2):49-55.
- Maxwell WMC, Welch GR, Johnson LA (1996). Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod. Fertil. Dev.*; 8:1165-1178.
- May-Panloup P, Chrétien MF, Jacques C, Vasseur C, Malthiery Y, Reynier P (2005). Low oocyte mitochondrial DNA content in ovarian insufficiency. *Hum. Reprod.*; 20(3):593-597.

- Mazur P, Schneider U (1986). Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implications. *Cell Biophys.*; 8(4):259-285.
- McLaren A (1975). Sex chimaerism and germ cell distribution in a series of chimaeric mice. *J. Embryol. Exp. Morph.*; 33(1):205-216.
- McNatty KP, Reader K, Heath DA, Juengel JL (2007). Control of ovarian follicular development to the gonadotrophin-dependent phase: a 2006 perspective. In 'Reproduction in Domestic Ruminants VI'. (Eds J. L. Juengel, J. F. Murray and M. F. Smith.) pp. 55–68.
- Memili E, First NL (1999). Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. *Biol. Reprod.*; 61:1198-1207.
- Merton JS, de Roos AP, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL, Dieleman SJ (2003). Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*; 59(2):651-674.
- Meuwissen TH, Hayes BJ, Goddard ME (2001).. *Genetics*; 157(4):1819-1829.
- Meyers SA (2005). Spermatozoal response to osmotic stress. *Anim. Reprod. Sci.*; 89:57-64.
- Mezzalira JC, Ohlweiler LU, da Costa Gerger RP, Casali R, Vieira FK, Ambrósio CE, Miglino MA, Rodrigues JL, Mezzalira A, Bertolini M (2011). Production of bovine hand-made cloned embryos by zygote-oocyte cytoplasmic hemi-complementation. *Cell Reprogram.*; 13(1):65-76.
- Misica-Turner PM, Oback FC, Eichenlaub M, Wells DN, Oback B (2007). Aggregating embryonic but not somatic nuclear transfer embryos increases cloning efficiency in cattle. *Biol. Reprod.*; 76(2):268-278.
- Mocé E, Graham JK, Schenk JL (2006). Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. *Theriogenology*; 66:929-936.
- Moore NW, Adams CE, Rowson LEA (1968). Developmental potential of single blastomeres of the rabbit egg. *J.Reprod.Fertil*; 17:527-531.
- Mossa F, Walsh SW, Butler ST, Berry DP, Carter F, Lonergan P, Smith GW, Ireland JJ, Evans AC. (2012) Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.*; 95(5):2355-2361.

- Mucci N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio RH (2006). Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*; 65(8):1551-62.
- Murakami M, Ferguson CE, Perez O, Boediono A, Paccamonti D, Bondioli KR, Godke RA (2006). Transfer of inner cell mass cells derived from bovine nuclear transfer embryos into the trophoblast of bovine in vitro-produced embryos. *Cloning Stem Cells*; 8(1):51-60.
- Murakoshi Y, Sueoka K, Takahashi K, Sato S, Sakurai T, Tajima H, Yoshimura Y (2013). Embryo developmental capability and pregnancy outcome are related to the mitochondrial DNA copy number and ooplasmic volume. *J Assist Reprod Genet.* [Epub ahead of print].
- Murray A, Hunt T (1993). *The Cell Cycle*. Oxford University Press, 251.
- Nagy A, Gocza E, Diaz EM, Prideaux VR, Ivanyi E, Markkula M, Rossant J (1990). Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development*; 110:815-821.
- Nagy S, Johannisson A, Wahlsten T, Ijäs R, Andersson M, Rodríguez-Martínez H (2013). Sperm chromatin structure and sperm morphology: their association with fertility in AI-dairy Ayrshire sires. *Theriogenology*; 79:1153-1161.
- Nicacio AC, Simões R, de Paula-Lopes FF, de Barros FR, Peres MA, Assumpção ME, Visintin JA (2012). Effects of different cryopreservation methods on post-thaw culture conditions of in vitro produced bovine embryos. *Zygote*; 20(2):117-122.
- Oback B, Wells DN (2003). Cloning cattle. *Cloning Stem Cells*; 5(4):243-256.
- Orgal S, Zeron Y, Elior N, Biran D, Friedman E, Druker S, Roth Z (2012). Season-induced changes in bovine sperm motility following a freeze-thaw procedure. *J. Reprod. Dev.*; 58(2):212-218.
- Ozawa M, Sakatani M, Yao J, Shanker S, Yu F, Yamashita R, Wakabayashi S, Nakai K, Dobbs KB, Sudano MJ, Farmerie WG, Hansen PJ (2012). Global gene expression of the inner cell mass and trophectoderm of the bovine blastocyst. *BMC Dev. Biol.*; 12:33.
- Ozil JP (1983). Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. *J. Reprod. Fert.*; 69:463-468.

- Ozil JP (1990). Parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical activation. *Development*; 109:117-127.
- Palma GA (2001). *Biología de la Reproducción*. Primera Edición. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). p.1-505.
- Palma GA, Alberio R, Brem G (1991). Moderne reproductionstechniken in der extensiven tierhaltung in argentinien. *Fortschritte in der Tierzucht* G. Brem (Ed.), Ulmer Verlag, 381-411.
- Papi M, Brunelli R, Familiari G, Frassanito MC, Lamberti L, Maulucci G, Monaci M, Pappalettere C, Parasassi T, Relucenti M, Sylla L, Ursini F, De Spirito M (2012). Whole-change in bovine zona pellucid biomechanics after fertilization: how relevant in hindering polyspermy? *PLoS One*; 7(9):e45696.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eystone WH (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*; 25:591-600.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod.*; 38:1171-1180.
- Pedersen HG, Schmidt M, Sangild PT, Strobec L, Vajta G, Callesen H, Greve T (2005). Clinical experience with embryos produced by handmade cloning: work in progress. *Mol. Cell. Endocrinol.*; 234:137-143.
- Pereyra-Bonnet F, Bevacqua R, La Rosa I, Sipowicz P, Radrizzani M, Fernandez-Martin R, Salamone DF (2011). Novel methods to induce exogenous gene expression in SCNT, IVF and parthenogenic bovine embryos. *Transgenic Res.*; 20(6):1379-88. Erratum in: *Transgenic Res.* 2011; 20(6):1389.
- Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y, Yanagimachi R (1999). Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science*; 284:1180-1183.
- Picard L, Chartrain I, King WA, Betteridge KJ (1990). Production of chimaeric bovine embryos and calves by aggregation of inner cell masses with morulae. *Mol. Reprod. Dev.*; 27(4):295-304.
- Picton H, Briggs D, Gosden R. (1998). The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol. Cell. Endocrinol.*; 145(1-2):27-37.

- Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TA, Taverne MA (1988). Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*;30(4):751-62.
- Pontes JHF, Melo-Sterza FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KCP, Seneda MM (2011). Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*; 75:1640-1646.
- Pontes JHF, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TRR, Oliveira JA, Hasler JF, Seneda MM (2009). Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*; 71:690-697.
- Pontes JHF, Silva KCF, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GMG, Sanches BV, Porcionato JPF, Vieira PHS, Faifer FS, Sterza FAM, Schenk JL, Seneda MM (2010). Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*; 74:1349-1355.
- Puglisi R, Vanni R, Galli A, Balduzzi D, Parati K, Bongioni G, Crotti G, Duchi R, Galli C, Lazzari G, Aleandri R (2006). In vitro fertilization with frozen-thawed bovine sperm sexed by flow cytometry and validated for accuracy by real-time PCR. *Reproduction*; 132:519-526.
- Rall WF, Meyer TK (1989). Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. *Theriogenology*; 31(3):683-692.
- Rasmussen S, Block J, Seidel GE Jr, Brink Z, McSweeney K, Farin PW, Bonilla L, Hansen PJ (2013). Pregnancy rates of lactating cows after transfer of in vitro produced embryos using X-sorted sperm. *Theriogenology*; 79(3):453-461.
- Ratto MH, Peralta OA, Mogollon G, Strobel P, Correa J (2011). Transvaginal ultrasound-guided cumulus oocyte complexes aspiration and in vitro embryo production in suckled beef and lactating dairy cattle on pasture-based management conditions. *Anim. Reprod. Sci.*; 129:1-6.
- Reis PO, Martins CM, Gimenes LU, Sales JNS, Baruselli PS (2010). Efeito da sincronização no início da emergência da onda folicular na OPU-PIV de Nelore (*Bos indicus*) e Brangus (*Bos taurus* x *Bos indicus*). Annual meeting Brazilian Embryo

- Technology Society (Porto de Galinhas, Brasil). *Acta Scientiae Veterinariae*.v.38.p.385 (Resumen).
- Reynier P, May-Panloup P, Chrétien MF, Morgan CJ, Jean M, Savagner F, Barrière P, Malthiery Y (2001). Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol. Hum. Reprod.*; 7(5):425-429.
- Rho GJ, Johnson WH, Betteridge KJ (1998). Cellular composition and viability of demi- and quarter-embryos made from bisected bovine morulae and blastocysts produced in vitro. *Theriogenology*; 50(6):885-895.
- Ribeiro ES, Gerger RP, Ohlweiler LU, Ortigari I Jr, Mezzalira JC, Forell F, Bertolini LR, Rodrigues JL, Ambrósio CE, Miglino MA, Mezzalira A, Bertolini M (2009). Developmental potential of bovine hand-made clone embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes. *Cloning and Stem Cells*; 11:377-386.
- Rizos D, Ward F, Boland MP, Lonergan P (2001). Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology*; 56(1):1-16.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.*; 61(2):234-248.
- Robertson E, Bradley A, Kuehn M, Evans M (1986). Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature*; 323(6087):445-448.
- Rodriguez KF, Farin CE (2004). Gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reprod. Fertil.Dev.*; 16:55-67.
- Rodríguez-Álvarez L, Cox J, Navarrete F, Valdes C, Zamorano T, Einspanier R, Castro FO (2009). Elongation and gene expression in bovine cloned embryos transferred to temporary recipients. *Zygote*; 17:353-365.
- Rodríguez-Martínez H (2003). Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia?. *Reprod. Domest. Anim.*, 38:312-318.

- Rodríguez-Martínez H (2007a). Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology*; 68; 138-146.
- Rodríguez-Martínez H (2007b). State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reprod., Fertil. Dev.*; 19:91-101.
- Rodríguez-Villamil P, Ongaratto F, Fernandez Taranco M, Bó G (2013). Solid-surface vitrification and in-straw dilution after warming of in vitro-produced bovine embryos. *Reprod. Domest. Anim.* [Epub ahead of print]
- Rossant J, Croy BA, Chapman VM, Siracusa L, Clark DA (1982). Interspecific chimeras in mammals: a new experimental system. *J. Anim. Sci.*; 55(5):1241-1248.
- Ruffing NA, Anderson GB, Bondurant RH, Currie WB, Pashen RI (1993). Effects of chimerism in sheep-goat concepti that developed from blastomere-aggregation embryos. *Biol. Reprod.*; 48:889-904.
- Sá Filho MF, Ayres H, Ferreira RM, Marques MO, Reis EL, Silva RC, Rodrigues CA, Madureira RH, Bó GA, Baruselli PS (2010). Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. *Theriogenology*; 73:651-658.
- Saito S, Sawai K, Ugai H, Moriyasu S, Minamihashi A, Yamamoto Y, Hirayama H, Kageyama S, Pan J, Murata T, Kobayashi Y, Obata Y, Yokoyama KK (2003). Generation of cloned calves and transgenic chimeric embryos from bovine embryonic stem-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 309(1):104-113.
- Salamone D, Barañao L, Santos C, Bussmann L, Artuso J, Werning C, Prync A, Carbonetto C, Dabsys S, Munar C, Salaberry R, Berra G, Berra I, Fernández N, Papouchado M, Foti M, Judewicz N, Mujica I, Muñoz L, Alvarez SF, González E, Zimmermann J, Criscuolo M, Melo C (2006). High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *J. Biotechnol.*; 124:469-472.
- Salamone DF, Adams GP, Mapletoft RJ (1999). Changes in the cumulus-oocyte complex of subordinate follicles relative to follicular wave status in cattle. *Theriogenology*; 52(4):549-561.
- Salamone DF, Barañao L (1995). Producción de los primeros terneros nacidos en la Argentina por maduración y fertilización in vitro de oocitos recuperados de animales

- sacrificados para consumo. Seminario Internacional de Embriones de Biotecnología y Tecnologías Avanzadas, 4 y 5 de Mayo, Montevideo, Uruguay. p.125.
- Salamone DF, Damiani P, Fissore RA, Robl JM, DUBY RT (2001). Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. *Biol. Reprod.*; 64(6):1761-1768.
- Sánchez R, Deppe M, Schulz M, Bravo P, Villegas J, Morales P, Risopatrón J (2011). Participation of the sperm proteasome during in vitro fertilisation and the acrosome reaction in cattle. *Andrologia*; 43(2):114-120.
- Santalo J, Estop AM, Egozcue J (1986). The chromosome complement of first-cleavage mouse embryos after in vitro fertilization. *J. In Vitro Fert. Embryo Transfer*; 3:99-105.
- Saragusty J, Arav A (2011). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*; 141(1):1-19.
- Sawyer HR, Smith P, Heath DA, Juengel JL, Wakefield StJ, McNatty KP (2002). Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol. Reprod.*; 66:1134–1150.
- Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT, Campbell BK, Downing JA, Findlay JK, Henderson KM, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, Tsonis CG (1993). A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod. Fertil. Dev.*; 5:459–478.
- Scaramuzzi RJ, Baird DT, Campbell BK, Driancourt MA, Dupont J, Fortune JE, Gilchrist RB, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, Monget P, Monniaux D, Viñoles C, Webb R (2011). Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*; 23:444–467.
- Schaeffer LR (2006). Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. *J. Anim. Breed. Genet.*; 123:218-223.
- Schenk JL, Suh TK, Cran DG, Seidel Jr GE (1999). Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology*; 52; 1375-1391.
- Schmidt M, Greve T, Avery B, Beckers JF, Sulon J, Hansen HB (1996). Pregnancies, calves and calf viability after transfer of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*; 46:527-539.

- Seidel GE Jr (1999). Commercializing reproductive biotechnology--the approach used by XY, Inc. *Theriogenology*; 51(1):5.
- Seidel GE Jr (2006). Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*; 65(1):228-235.
- Shiue YL, Liou JF, Shiau JW, Yang JR, Chen YH, Tailiu JJ, Chen LR (2006). In vitro culture period but not the passage number influences the capacity of chimera production of inner cell mass and its deriving cells from porcine embryos. *Anim. Reprod. Sci.*; 93:134-143.
- Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*; 65:126-136.
- Sirisha K, Selokar NL, Saini M, Palta P, Manik RS, Chauhan MS, Singla SK (2013). Cryopreservation of zona-free cloned buffalo (*Bubalus Bubalis*) embryos: slow freezing vs open-pulled straw vitrification. *Reprod. Domest. Anim.*; 48(4):538-44.
- Skrzyszowska M, Smorag Z (1989). Cell loss in bisected mouse, sheep and cow embryos. *Theriogenology*; 32:115-122.
- Skrzyszowska M, Smorag Z, Katska L (1997). Demi-embryo production from hatching of zona-drilled bovine and rabbit blastocysts. *Theriogenology*; 48:551-557.
- Slimane W, Heyman Y, Lavergne Y, Humblot P, Renard JP (2000). Assessing chromosomal abnormalities in two-cell bovine in vitro-fertilized embryos by using fluorescent in situ hybridization with three different cloned probes. *Biol. Reprod.*; 62:628-635.
- Smith C (1988). Applications of embryo transfer in animal breeding. *Theriogenology*; 29:203-12.
- Smith LC, Alcivar AA (1993). Cytoplasmic inheritance and its effects on development and performance. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*; 48:31-43.
- Smith LC, Suzuki J Jr, Goff AK, Fillion F, Therrien J, Murphy BD, Kohan-Ghadr HR, Lefebvre R, Brisville AC, Buczinski S, Fecteau G, Percin F, Meirelles FV (2012). Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. *Reprod. Domest. Anim.*; 47 Suppl. 4:107-114.
- Snow MHL (1975). Embryonic development of tetraploid mice during the second half of gestation. *Embryol. Exp. Morph.*; 34(3):707-721.

- Spencer TE, Sandra O, Wolf E (2008). Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction*; 135:165-179.
- Spindle A, Wu K, Pedersen RA (1982). Sensitivity of early mouse embryos to [3H]thymidine. *Exp. Cell. Res.*; 142(2):397-405.
- St John JC, Lloyd RE, Bowles EJ, Thomas EC, El Shourbagy S (2004). The consequences of nuclear transfer for mammalian foetal development and offspring survival. A mitochondrial DNA perspective. *Reprod.*; 127:631-641.
- Stewart BM, Block J, Morelli P, Navarette AE, Amstalden M, Bonilla L, Hansen PJ, Bilby TR (2011). Efficacy of embryo transfer in lactating dairy cows during summer using fresh or vitrified embryos produced in vitro with sex-sorted semen. *J. Dairy Sci.*; 94:3437-3445.
- Stroud B (2012). IETS 2012 Statistics and data retrieval committee report. Champaign, IL: IETS.
- Sudano MJ, Paschoal DM, Rascado TD, Magalhaes LCO, Crocomo LF, Lima-Neto JF, Landim-Alvarenga FD (2011). Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*; 75:1211-1220.
- Sudano MJ, Santos VG, Tata A, Ferreira CR, Paschoal DM, Machado R, Buratini J, Eberlin MN, Landim-Alvarenga FD (2012). Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. *Biol. Reprod.*; 887(6):130.
- Sugawara K, Kizaki K, Herath CB, Hasegawa Y, Hashizume K (2010). Transforming growth factor beta family expression at the bovine feto-maternal interface. *Reprod. Biol. Endocrinol.*; 8: 120.
- Sugimura S, Akai T, Hashiyada Y, Somfai T, Inaba Y, Hirayama M, Yamanouchi T, Matsuda H, Kobayashi S, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi E, Konishi K, Imai K (2012). Promising system for selecting healthy in vitro-fertilized embryos in cattle. *PLoS One*; 7(5):e36627.
- Summers PM, Shelton JN, Bell K (1983). Synthesis of primary *Bos taurus*-*Bos indicus* chimaeric calves. *Anim. Reprod. Sci.*; 6:91-102.

- Suo L, Wang F, Zhou GB, Shi JM, Wang YB, Zeng SM, Tian JH, Zhu SE, Liu GS (2009). Optimal concentration and electric field levels improve tetraploid embryo production by electrofusion in mice. *J. Rep. Dev.*; 55(4):383-385.
- Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*; 402:371-372.
- Szöllösi M, Kubiak J, Debey P, De Pennard H, Szöllösi D, Maro B (1993). Inhibition of protein kinases by 6-dimethylaminopurine accelerates the transition to interphase in activated mouse oocytes. *J. Cell. Sci.*; 104:861-872.
- Tagawa M, Matoba S, Narita M, Saito N, Nagai T, Imai K (2008). Production of monozygotic twin calves using the blastomere separation technique and Well of the Well culture system. *Theriogenology*; 69:574-582.
- Takahashi K, Yamanaka S (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*; 126:663-676.
- Tan SJ, Lu KH (1990). Effects of different oestrous stages of ovaries and sizes of follicles on generation of bovine embryo in vitro. *Theriogenology*; 33:335.
- Taneja M, Bols PEJ, Van de Velde A, Ju J-C, Schreiber D, Tripp MW, Levine H, Echelard Y, Riesen J, Yang X (2000). Development competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biol. Reprod.*; 62:206-213.
- Tarkowski AK, Ozdzinski W, Czolowska R (2005). Identical triplets and twins developed from isolated blastomeres of 8- and 16-cell mouse embryos supported with tetraploid blastomeres. *Int. J. Dev. Biol.*; 49(7):825-832.
- Tarkowsky AK, Witkowska K, Opas J (1977). Development of cytochalasin-B induced tetraploid and diploid/tetraploid mosaic mice embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.*; 41:47-64.
- Taşdemir U, Büyükleblebici S, Tuncer PB, Coşkun E, Ozgürtaş T, Aydın FN, Büyükleblebici O, Gürcan IS (2013). Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. *Cryobiology*; 66(1):38-42.
- Tecirlioglu RT, French AJ, Lewis IM, Vajta G, Korfiatis NA, Hall VJ, Ruddock NT, Cooney A, Trounson AO (2003). Birth of a cloned calf derived from a vitrified hand-made cloned embryo. *Reprod. Fertil. Dev.*; 15(7-8):361-366.

- Tecirlioglu RT, Cooney MA, Lewis IM, Korfiatis NA, Hodgson R, Ruddock NT, Vajta G, Downie S, Trounson AO, Holland MK, French AJ (2005). Comparison of two approaches to nuclear transfer in the bovine: hand-made cloning with modifications and the conventional nuclear transfer technique. *Reprod. Fertil. Dev.*; 17(5):573-585.
- Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LE (1972). Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.*; 30:493-497.
- Tong M, Lv Z, Liu L, Zhu H, Zheng QY, Zhao XY, Li W, Wu YB, Zhang HJ, Wu HJ, Li ZK, Zeng F, Wang L, Wang XJ, Sha JH, Zhou Q (2011). Mice generated from tetraploid complementation competent iPS cells show similar developmental features as those from ES cells but are prone to tumorigenesis. *Cell Res.*; 21:1634-1637.
- Torres-Júnior JRS, Pires MFA, Sá WF, Ferreira AM, Viana JH, Camargo LS, Ramos AA, Folhadella IM, Polisseni J, Freitas C, Clemente CA, Sá Filho MF, Paula-Lopes FF, Baruselli PS (2008). Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*; 69:155-166.
- Trounson AO, Shea BF, Ollis GW, Jacobson ME (1978). Frozen storage and transfer of bovine embryos. *J. Anim. Sci.*; 47(3):677-681.
- Trounson AO, Willadsen SM, Rowson LE (1976). The influence of in-vitro culture and cooling on the survival and development of cow embryos. *J. Reprod. Fertil.*; 47(2):367-370.
- Ueda O, Jishage K, Kamada N, Satomi U, Suzuki H (1995). Production of mice entirely derived from embryonic stem (ES) cell with many passages by coculture of ES cells with cytochalasin B induced tetraploid embryos. *Exp. Anim.*; 44(3):205-210.
- Vajta G, Lewis IM, Hyttel P, Thouas GA, Trounson AO (2001). Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning*; 3(2):89-95.
- Vajta G, Peura TT, Holm P, Paldi A, Greve T, Trounson AO, Callesen H (2000). New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. *Mol. Reprod. Dev.*; 55:256-264.
- Vajta G (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.*; 60-61:357-364.
- Vajta G, Kragh PM, Mtango NR, Callesen H (2005). Hand-made cloning approach: potentials and limitations. *Reprod. Fertil. Dev.*; 17(1-2):97-112.

- Vajta G, Kuwayama M (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*; 65(1):236-244.
- Vajta G, Lewis IM, Trounson AO, Purup S, Maddox-Hyttel P, Schmidt M, Pedersen HG, Greve T, Callesen H (2003). Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency in vitro. *Biol. Reprod.*; 68(2):571-578.
- Vajta G, Rindom N, Peura TT, Holm P, Greve T, Callesen H (1999). The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after Open Pulled Straw (OPS) vitrification. *Theriogenology*; 52(5):939-948.
- Van de Velde H, Cauffman G, Tournaye H, Devroey P, Liebaers I (2008). The four blastomeres of a 4-cell stage human embryo are able to develop individually into blastocysts with inner cell mass and trophectoderm. *Hum. Reprod.*; 23(8):1742-1747.
- van Wagtenonk-de Leeuw AM, den Daas JH, Rall WF (1997). Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology*; 48(7):1071-1084.
- Vassena R, Mapletoft RJ, Allodi S, Singh J, Adams GP (2003). Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology*; 60(5):923-932.
- Viana JHV (2012). Levantamento estadístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. *OEmbrião*; 51:6-10.
- Viuff D, Greve T, Avery B, Hyttel P, Brockhoff PB, Thomsen PD (2000). Chromosome aberrations in in vitro-produced bovine embryos at Days 2-5 post-insemination. *Biol. Reprod.*; 63:1143-1148.
- Viuff D, Palsgaard A, Rickords L, Lawson LG, Greve T, Schmidt M, Avery B, Hyttel P, Thomsen PD. (2002). Bovine embryos contain a higher proportion of polyploid cells in the trophectoderm than in the embryonic disc. *Mol. Reprod. Dev.*; 62(4):483-488.
- Wakayama S, Hikichi T, Suetsugu R, Yuko S, Bui HT, Mizutani E, Wakayama T (2007). Efficient establishment of mouse embryonic stem cell lines from single blastomeres and polar bodies. *Stem Cells*; 25:986-993.

- Wakayama S, Ohta H, Hikichi T, Mizutani E, Iwaki T, Kanagawa O, Wakayama T (2008). Production of healthy cloned mice from bodies frozen at -20 degrees C for 16 years. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.;105(45):17318-17322.
- Wakayama S, Ohta H, Hikichi T, Mizutani E, Iwaki T, Kanagawa O, Wakayama T (2008). Production of healthy cloned mice from bodies frozen at -20 degrees C for 16 years. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.; 105(45):17318-17322.
- Westhusin ME, Collas P, Marek D, Sullivan E, Stepp P, Pryor J, Barnes F (1996). Reducing the amount of cytoplasm available for early embryonic development decreases the quality but not the quantity of embryos produced by in vitro fertilization and nuclear transplantation. Theriogenology; 46:243-252.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P (1972). Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. Science; 178(4059):411-414.
- Willadsen SM (1979). A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. Nature; 277:298-300.
- Willadsen SM (1981). The development capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos. J. Embryol. Exp. Morphol.; 15:165-172.
- Willadsen SM, Polge C (1981). Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. Vet. Rec.; 108:211-213.
- Willadsen SM, Godke RA (1984). A simple procedure for the production of identical sheep twins. Vet. Rec.; 114(10):240-243.
- Williams CJ (2002). Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. Hum. Reprod. Update; 8:313-321.
- Williams SW, Stanko RL, Amstalden M, Williams GL (2002). Comparison of three approaches for synchronization of ovulation for timed artificial insemination in Bos indicus-influenced cattle managed on the Texas gulf coast. J.Anim.Sci.; 80:1173-1178.
- Williams TJ, Elsdon RP, Seidel Jr GE (1984). Pregnancy rates with bisected bovine embryos. Theriogenology; 22:521-531.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature; 385:810-813. Erratum in: Nature 1997.

- Wilmut I, Rowson LE (1973). The successful low-temperature preservation of mouse and cow embryos. *J. Reprod. Fertil.*; 33(2):352-353.
- Wilson RD, Weigel KA, Fricke PM, Rutledge JJ, Leibfried-Rutledge ML, Matthews DL, Schutzkus VR (2005). In vitro production of Holstein embryos using sex-sorted sperm and oocytes selected cullcows. *J. Dairy Sci.*; 88(2):776-782.
- Wimsatt WA (1951). Observations on the morphogenesis, cytochemistry, and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants. *Am. J. Anat.*; 89(2):233-281.
- Wintenberger-Torres S, Flechon JE (1974). Ultrastructural evolution of the trophoblast cells of the pre-implantation sheep blastocyst from day 8 to day 18. *J. Anat.*; 118:143-153.
- Wood SA, Allen ND, Rossant J, Auerbach A, Nagy A (1993b). Non-injection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimaeras. *Nature*; 365(6441):87-89.
- Wood SA, Pascoe WS, Schmidt C, Kemler R, Evans MJ, Allen ND (1993a). Simple and efficient production of embryonic stem cell-embryo chimeras by coculture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 90(10):4582-4585.
- Xu J, Chaubal SA, Du F (2009). Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. *Theriogenology*; 71:39-47.
- Xu J, Guo Z, Su L, Nedambale TL, Zhang J, Schenk J, Moreno JF, Dinnyés A, Ji W, Tian XC, Yang X, Du F (2006). Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex-sorted sperm. *J. Dairy Sci.*; 89(7):2510-2518.
- Yaeram J, Setchell BP, Maddocks S (2006). Effect of heat stress on the fertility of male mice in vivo and in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.*; 18:647-653.
- Yang MY, Fortune JE (2008). The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during midgestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. *Biol. Reprod.*; 78:1153-1161.
- Yu XL, Deng W, Liu FJ, Li YH, Li XX, Zhang YL, Zan LS (2010). Closed pulled straw vitrification of in vitro-produced and in vivo-produced bovine embryos. *Theriogenology*; 73(4):474-479.
- Zakhartchenko V, Wolf E, Palma GA, Brem G (1995). Effect of donor embryo cell number and cell size on the efficiency of bovine embryo cloning. *Mol. Reprod. Dev.*; 42(1):53-57.

- Zhang M, Lu KH, Seidel Jr GE (2003). Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. *Theriogenology*; 60:1657-1663.
- Zhou W, Xiang T, Walker S, Abruzzese RV, Hwang E, Farrar V, Findeisen B, Sadeghieh S, Arenivas F, Chen SH, Polejaeva I (2008). Aggregation of bovine cloned embryos at the four cell stage stimulated gene expression and in vitro embryo development. *Mol. Reprod. Dev.*; 75:1281-1289.