



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

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

Beatriz Helena Bernal Ballesteros

Tesis
Para obtener el Grado Académico de
Magíster en Reproducción Bovina

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados

Instituto de Reproducción Animal Córdoba
(IRAC)

Córdoba, Noviembre de 2016



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

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

Beatriz Helena Bernal Ballesteros

Comisión Asesora de Tesis

Director: M.V., Dr. (M.B.A.) Humberto Tribulo

Co-Director: B.Sc., MsC, Ph.D Adrián Mutto

Tribunal Examinador de Tesis

B.Sc., PhD Mariana Caccia

M.V. Sc, Ph.D. Paula Rodríguez

M.V. Sc, Ph.D. Gabriel Bo

Presentación Formal Académica

Córdoba, 16 de Noviembre de 2016

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

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

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

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

A mi familia y amigos, a todos gracias.

A mi familia, motor e inspiración.

RESUMEN

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

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

ABSTRACT

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

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

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Capítulo 1	1
INTRODUCCION	1
Criopreservación	4
Radicales libres y estrés oxidativo	6
Factores de crecimiento o factores tróficos	8
Factor de crecimiento epidermal	9
Antioxidantes	11
Glutación	12
Cisteamina	13
Acidos grasos insaturados	14
Ácido linoleico	15
Lecitina de soja	16
HIPOTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECIFICOS	18
Capítulo 2	20
MATERIALES Y METODOS	20
Producción <i>in vitro</i> de embriones	20
Obtención y acondicionamiento de los ovarios	20
Recolección y selección de los COC's	20
Maduración <i>in vitro</i>	21
Fertilización <i>in vitro</i>	21
Manejo del semen	21
Manejo de los ovocitos	22
Cultivo embrionario <i>in vitro</i>	22
Criopreservación de los embriones obtenidos	23
Congelamiento	23
Descongelamiento	23
Experimento 1	24

Experimento 2	24
Experimento 3	25
Experimento 4.....	25
Experimento 5	26
Experimento 6	26
Experimento 7	27
Análisis Estadístico	27
Capítulo 3	29
RESULTADOS	29
Experimento 1	29
Experimento 2	30
Experimento 3	32
Experimento 4	33
Experimento 5	37
Experimento 6	40
Experimento 7	42
Capítulo 4	45
DISCUSIÓN	45
Capítulo 5	57
CONCLUSIONES	57
Capítulo 6	59
BIBLIOGRAFIA CITADA	59

LISTA DE TABLAS

Tabla 3.1. Porcentaje de Producción Embrionaria con adición de EGF al medio de MIV.....	29
Tabla 3.2. Extrusión de Primer Cuerpo Polar de ovocitos madurados con EGF.....	30
Tabla 3.3. Supervivencia de embriones congelados y tratados en MIV con EGF.....	30
Tabla 3.4. Porcentaje de Producción de Embriones con adición de Cisteamina al medio MIV.....	31
Tabla 3.5. Extrusión Primer Cuerpo Polar de ovocitos madurados con Cisteamina...31	
Tabla 3.6. Supervivencia de embriones congelados-tratados en MIV con Cisteamina.32	
Tabla 3.7. Porcentaje de Producción de Embriones tratados con 100 μ M de Cisteamina y 100 ng/ml de EGF en el medio MIV	32
Tabla 3.8. Extrusión de Primer Cuerpo Polar de ovocitos madurados con 100 μ M de Cisteamina y 100 ng/ml de EGF.....	33
Tabla 3.9. Supervivencia de embriones congelados y tratados en MIV con EGF y Cisteamina	33
Tabla 3.10. Porcentaje de Producción de Embriones obtenidos con la adición de Cisteamina en el medio CIV en Día 3 o Día 5	35
Tabla 3.11. Número de células de embriones tratados con Cisteamina en el medio CIV en Día 3 o Día 5.....	35
Tabla 3.12. Porcentaje de Producción de Embriones con adición de Ácido Linoleico en el medio CIV.....	38
Tabla 3.13. Número de células de embriones tratados con Ácido Linoleico.....	38
Tabla 3.14. Porcentaje de Producción de Embriones con adición de Fosfatidilcolina de soja en el medio CIV en Día 3 o Día 5.....	40
Tabla 3.15. Número de células de embriones tratados con Fosfatidilcolina de soja...41	

Tabla 3.16. Porcentaje de Producción de Embriones con adición de Cisteamina, Ácido Linoleico y Fosfatidilcolina de soja en el medio CIV en Día 5.....	43
Tabla 3.17. Número de células de embriones tratados con Cisteamina, Ácido Linoleico y Fosfatidilcolina de Soja en el medio de CIV.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Diagrama de Box de re – expansión a las 24 hs. de embriones tratados con cisteamina en el medio CIV en Día 3 o Día 5.....	36
Figura 3.2. Diagrama de Box de eclosión a las 72 hs. de embriones tratados con cisteamina en el medio CIV en Día 3 o Día 5.....	36
Figura 3.3. Diagrama de Box de re – expansión a las 24 hs. de embriones tratados con Ácido linoleico en el medio CIV en Día 3 o Día 5.....	39
Figura 3.4. Diagrama de Box de eclosión a las 72 hs. de embriones tratados con Ácido Linoleico en el medio CIV en Día 3 o Día 5.....	39
Figura 3.5. Diagrama de Box de re – expansión a las 24 hs. de embriones tratados con Fosfatidilcolina de soja en el medio CIV en Día 3 o Día 5.....	41
Figura 3.6. Diagrama de Box de eclosión a las 72 hs. de embriones tratados con Fosfatidilcolina de soja en el medio CIV en Día 3 o Día 5.....	42
Figura 3.7. Diagrama de Box de re – expansión a las 24 hs. de embriones tratados con Cist. + AL + LS en el medio CIV en Día 3 o Día 5.....	44
Figura 3.8. Diagrama de Box de eclosión a las 72 hs. de embriones tratados con Cist. + AL + LS en el medio CIV en Día 3 o Día 5.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ACC	Acetil – CoA – carboxilasa.
ADN	Acido desoxirribonucleico.
AGPAT	1 – acilglicerol, 3 – fosfato o – aciltransferasa.
AL	Acido linoleico.
ALA	Acido α -linólenico.
BSA	Albúmina Sérica Bovina.
CLA	Acido Linóleico Conjugado.
CO ₂	Dióxido de Carbono.
CR _{2aa}	Medio Charles Rosenkranz 2 con aminoácidos.
Da	Daltón.
FIV	Fertilización In Vitro.
FSH – rh	Hormona Folículo Estimulante – Recombinante Humana.
C ¹³	Carbono 13.
°C	Grados centígrados.
CIV	Cultivo In Vitro.
EG	Etilenglicol.
EGF	Factor de Crecimiento Epidermal.
ER	Retículo Endoplasmático.
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno.

FAS	Ácido graso sintetasa.
FSH – rh	Hormona folículo estimulante – humano recombinante.
G6PDH	glucosa – 6 – fosfato hidrogenasa.
GSH	Glutation Reducido.
h	Hora.
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno.
ICM	Masa Intracelular.
IETS	Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones.
LS	Lecitina de Soja.
MIV	Maduración In Vitro.
MOET	Multiovolación y transferencia de embriones.
nL/h	nanolitros por hora.
Ng	Nanogramos.
M	Molar.
Mg	Miligramos.
Min	minutos.
ml	mililitros.
µg	Microgramos.
mM	milimolar.
m-RNA	Ácido Ribonucleico – mensajero.
µM	Micromolar.
N ₂	Nitrógeno.

OPU	Aspiración Folicular transvaginal guiada por ultrasonografía.
O ₂	Oxígeno.
O ₂ ⁻	Anión superóxido.
OH ⁻	Radical Hidróxilo.
PBS m	Buffer fosfato salino – modificado.
PIVE	Producción In Vitro de Embriones.
PK – L	L – Piruvato quinasa.
p/v	Peso / volumen.
rpm	Revoluciones por minuto.
S	Segundos.
SCF	Suero Fetal de Ternero.
SFB	Suero Fetal Bovino.
SOF	Fluido sintético oviductal.
Spz	Espermatozoides.
TCM – 199	Medio de cultivo tisular.
TE	Trofoectodermo.
v/v.....	Volumen a volumen.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

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

La técnica se basa en la extracción de los ovocitos de los ovarios bovinos mediante la aspiración folicular transvaginal guiada mediante ecografía (OPU: Ovum pick – up) o a partir de ovarios de frigorífico para fines comerciales o investigativos (Hasler, 1998; Pontes et al., 2011). Los ovocitos recuperados son madurados en medios específicos que son suplementados con hormonas en distintas concentraciones y suero, luego fertilizados y finalmente puestos en cultivo durante siete días, para finalmente ser transferidos en fresco o criopreservados (Hasler, 1995; Galli et al, 2001; Mucci et al., 2005; Chaubal et al, 2006; Looney, 2009).

Una de las mayores desventajas de la aplicación comercial de la técnica de Fertilización *in vitro* (FIV), se refiere a las bajas tasas de preñez obtenidas con los embriones criopreservados comparados con los obtenidos por MOET (Rizos et al., 2008; Zullo et al., 2016), esto se denota en los datos de transferencia de embriones del año 2014 (Perry, 2015).

En el año 2014 a nivel mundial se realizaron 94,666 colectas *in vivo* y se transfirieron 614, 582 embriones (En fresco: 201,960 y congelados: 262,622); mientras que en *in vitro* se realizaron 129,098 aspiraciones y se transfirieron 364,727 embriones (En fresco: 296,666 y criopreservados: 68,061). En Sur América se transfirieron 211,177 embriones en fresco y 40,096 congelados. Los embriones *in vitro* criopreservados sólo

corresponden al 19% del total transferido a nivel mundial; siendo un porcentaje muy bajo, comparado con el 57% de embriones congelados, transferidos y obtenidos con la técnica de lavado convencional (262.622/877.086) (Perry, 2015).

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

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

El embrión obtenido por FIV es sensible a la congelación, debido a las lesiones que presenta durante la etapa de congelado; ya que tienen un mayor contenido de lípidos, principalmente a nivel citoplasmático (Holm et al., 1998; Holm et al., 2002; Seidel, 2006; Pryor et al., 2008), siendo más oscuros y con menor densidad. Presentan una disminución en el número de blastómeras, una zona pelúcida más frágil y una velocidad de desarrollo mayor (Abe, 2003). A nivel funcional, presentan anormalidades en las uniones intercelulares, por la expresión anormal de las proteínas que conforman las uniones gap, acentuándose en la células trofoblásticas (Boni et al., 1999; Fair et al., 2001); así como también presentan alteraciones génicas, cromosómicas y metabólicas, al presentar una mayor concentración de triglicéridos (Iwasaki et al., 1990; Abe et al., 1999 a; Abe et al., 1999 b; Khurana et al., 2000; Fair et al., 2001; Rizos et al., 2002; Viuff et al., 2002; Corcoran et al., 2006., Lonergan et al., 2008; Zullo et al., 2016). También presentan una mayor incidencia de apoptosis (Rizos et al., 2002; Pomar et al., 2005).

Los anteriores factores afectan la supervivencia de los embriones *in vitro*, es por este motivo que se debe mejorar la calidad de los blastocitos producidos mediante el mejoramiento en la formulación de los medios de cultivo (Ludwing, 1999) y en el

desarrollo de protocolos adecuados de criopreservación, lo que permitiría una mayor supervivencia durante el proceso de congelación /descongelación (Seidel, 2006).

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

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

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

CRIOPRESERVACION

La criopreservación, es el proceso por el cual se congelan las células y tejidos a temperaturas muy bajas (por lo general entre $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, esta última es el punto de ebullición del nitrógeno líquido), con el fin de mantener la viabilidad y la funcionalidad celular y la criobiología estudia los efectos de las bajas temperaturas sobre los sistemas celulares, enfatizando en las reacciones bioquímicas que son determinadas por el “frío”, debido a que presenta efectos y/o variaciones en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas que pueden alterar las membranas celulares, organelos e interacción célula – célula (Ávila-Portillo et al., 2006; Woods et al., 2004).

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

La membrana plasmática de la célula eucariota, independientemente de su composición, tiene una estructura organizada según el modelo de mosaico fluido, su composición básica consiste en lípidos anfipáticos, proteínas y un pequeño porcentaje de carbohidratos que varía según el tipo y especie celular (Mc Evoy et al, 2000; Ávila-Portillo et al., 2006). Los lípidos (colesterol y ácidos grasos) son los componentes de mayor proporción en la membrana plasmática, determinando la fluidez y resistencia de esta, durante los procesos de congelación (Zeron et al.; 2001, Zeron et al., 2002; Avila-Portillo et al., 2006). El empaquetamiento y la posición de estas moléculas en las bicapas determinan la rigidez de las membranas y por tanto el transporte de moléculas. Este transporte a través de las membranas es el punto crítico para la supervivencia celular post - descongelación (Zeron, 2002; Avilla-Portillo et al, 2006).

En los procesos de congelación, las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño por la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos, la transición

de lípidos fluidos a sólidos se da a una temperatura de 10°C - 16°C, cambiando las funciones de la membrana y dándole un alto grado de fragilidad (Boiso, 2001). Durante la deshidratación celular que se da durante la congelación se pueden presentar pérdidas de lípidos, que afectarían la integridad de la membrana plasmática por la pérdida de la capacidad de expansión durante la rehidratación al volver a condiciones isotónicas (Ávilla-Portillo et al., 2006). Durante la congelación por lo general se presenta lesión celular por la formación de hielo intracelular y por el estrés osmótico al que se ven sometidas las membranas celulares (Seidel, 2006). Esto se relaciona con el efecto de la deshidratación producida durante la concentración de solutos y la muerte celular, con la vuelta a las condiciones isotónicas después de la congelación (choque osmótico), debido a la reducción del volumen por el aumento de la osmolaridad extracelular. A medida que la célula pierde agua, la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo volumen, y al excederse la resistencia física de la membrana se producen cambios irreversibles en la permeabilidad. En este caso los crioprotectores por sus propiedades coligativas disminuyen la cantidad de hielo formado a cierta temperatura (Meryman, 1971; Boiso, 2001; Avila-Portillo et al., 2006).

El alto contenido de lípidos neutros, principalmente triglicéridos almacenados en las gotas citoplasmáticas presentes en las blastómeras de los embriones *in vitro*, asociado con una disminución en la concentración de ácidos grasos poli-insaturados en la membrana fosfolípida, son los factores causales de la baja crio-resistencia (Bailey et al., 2015; Pereira Batista et al., 2014). Esta excesiva acumulación de lípidos neutros endógenos afecta el equilibrio de deshidratación y re-hidratación durante el congelado – descongelado del embrión (Rizos et al, 2003; Abe et al, 2004; Seidel, 2006).

Tanto los ovocitos como los embriones *in vitro* obtenidos de razas *Bos indicus* y sus cruza presentan un mayor contenido y acumulación de lípidos neutros en el citoplasma con respecto a los de *Bos taurus*, haciéndolos más sensibles a la congelación y disminuyendo su fertilidad (Ballard et al, 2007; Velásquez, 2011; Pereira Batista et al., 2014). El aumento de la composición de ácidos grasos en el complejo cúmulo – ovocito (COC's) disminuyen la competencia de desarrollo del ovocito (Adamiak et al, 2006; Velásquez, 2011).

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

RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO

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

Se forman como consecuencia de una reacción metabólica dentro de las células o de manera espontánea si las condiciones del medio lo permiten. Dentro de la célula existen muchos sitios de formación de especies reactivas ya sea del Oxígeno (O₂) o del Nitrógeno (N₂). La cadena respiratoria de las mitocondrias, es el principal sitio de producción de especies reactivas del oxígeno, seguido por los peroxisomas y el citosol. Los radicales libres derivados del nitrógeno, se producen en su mayoría en el citosol de la célula (Gutiérrez, 2006.).

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

Las ERO en excesivas cantidades inducen a un estrés oxidativo, que exceden las defensas antioxidantes, con efectos tóxicos debido a la oxidación de lípidos, proteínas y

ácidos nucleicos, pudiendo producir daño oxidativo del ADN (Agnéz – Lima et al., 2012); además de alterar la función o estructura celular (Gutiérrez, 2006). Es así como el estrés oxidativo, es la perturbación del equilibrio entre pro – oxidantes y antioxidantes, en favor de los primeros, dando lugar a cambios en las biomoléculas y afectando su función (Kosower, 1983; Agarwal et al., 2005).

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

1. Lípidos: Al presentarse la peroxidación lipídica, se afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, alterando la permeabilidad de la membrana celular, produciéndose edema y muerte celular (Cárdenas-Rodríguez, 2006). En la magnitud de la peroxidación lipídica, influyen los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la membrana celular y su accesibilidad, la tensión de oxígeno, el contenido celular de antioxidantes, entre otros (Guérin et al., 2001).
2. Proteínas: Presentándose oxidación de un grupo de aminoácidos, tales como: fenilalanina, tirosina, histidina y metionina. Se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas y formación de grupos carbonilo (Venerao Gutiérrez, 2002).
3. Ácido desoxirribonucleico (ADN): Manifestándose en mutaciones, pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes (Guérin et al., 2001; Venerao Gutiérrez, 2002; Agnez-Lima et al., 2012).

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

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

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

FACTORES DE CRECIMIENTO O FACTORES TROFICOS

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

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

La calidad intrínseca de los ovocitos determina la calidad del embrión; pero las condiciones de cultivo durante la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos, puede influir significativamente sobre el desarrollo ovocitario, la tasa de fecundación *in vitro* y posterior desarrollo embrionario, es por esta razón que generalmente se adicionan factores tróficos (Hernández-Fonseca et al., 2004; Sirisathien et al., 2003; Lonergan, 2008.).

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

Factor de Crecimiento Epidermal

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

El EGF se ha encontrado en folículos preantrales y antrales pequeños de hámster, estimula la síntesis de ADN y la proliferación de células de la granulosa en bovinos y porcinos e inhibe su diferenciación; acorta el tiempo requerido para la ruptura de la

vesícula germinal, promoviendo la reanudación de la meiosis (Harper, 1993). Incrementa la actividad de la enzima superóxido de dismutasa, enzima que actúa sobre el anión superóxido bloqueando al radical oxígeno, disminuyendo de esta forma la oxidación celular (Cornejo, 2011).

Las células del cúmulo y de la granulosa tienen receptores para EGF, por lo que el EGF intrafolicular puede actuar como un factor proliferante sobre las células de la granulosa (Hernández-Fonseca et al., 2004). En diversos trabajos se ha sugerido su influencia positiva sobre la tasa de división post-fecundación y el subsecuente desarrollo embrionario (Harper, 1993; Lonergan et al., 1996; Hernández-Fonseca et al., 2004; Oyamada, 2004 b).

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

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

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

ANTIOXIDANTES

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

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

Sistemas antioxidantes como el glutatión (GSH), atenúan los efectos negativos del estrés oxidativo por el barrido de ERO (Castillo et al., 2001). La adición de estos compuestos a los medios de producción *in vitro* de embriones bovinos (PIVE), reduce la formación de radicales libres, y los más empleados son: Glutatión, Albúmina Sérica Bovina (BSA), piruvato de sodio, ácido ascórbico, catalasa, etc. (Hasler, 2010).

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

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

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

Algunos autores han reportado que la suplementación con antioxidantes durante la MIV y/o CIV reduce los niveles intracelulares de ERO y la tasa de apoptosis, sin embargo la suplementación no aumenta el desarrollo embrionario y la supervivencia después de vitrificación (Rocha-Frigoni, 2012 b; Rocha-Frigoni, 2014).

Glutación

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

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

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

El sistema formado por el glutación y las enzimas que intervienen en el ciclo redox del glutación forman el principal sistema de defensa a nivel intracelular frente a las agresiones oxidativas, por lo cual actúan en el mantenimiento de la integridad de la membrana celular y en la regulación de la proliferación celular (Kosower, 1983; Dickinson, 2002; Martínez et al., 2006).

Cisteamina

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

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

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

Se reporta que suplementado en concentraciones de 12,5 a 500 μM proporciona mayor desarrollo embrionario y en el rango de 100 a 150 μM aporta en la calidad (Takahashi et al., 1993; Caamaño et al., 1996).

ACIDOS GRASOS INSATURADOS

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

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

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

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

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

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

Ácido linoleico

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

Los CLA (Ácido linoleico conjugado) son un grupo de isómeros del ácido linoleico, han demostrado actividad antilipogénica, especialmente el trans - 10, cis - 12 (Evans et al., 2002). Son potentes inhibidores de la glucólisis y la lipogénesis de novo, a través de la regulación de los genes glucosa - 6 - fosfato deshidrogenasa (G6PDH), L - Piruvato quinasa (PK - L), ácido graso sintetasa (FAS) y acetil - CoA carboxilasa (ACC) (Dentin et al., 2005).

El ácido linoleico conjugado (CLA) se ha empleado en las dietas bovinas y en la suplementación de los medios de cultivo *in vitro* Bovino, para mejorar la supervivencia embrionaria ya que altera la composición lipídica de la membrana celular, inhibiendo la síntesis lipídica y regulando la expresión de genes que involucran la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos (Bailey et al., 2015). Algunos estudios con pre-neoplásicos, neoplásicos y células glandulares mamarias han demostrado que puede inducir apoptosis, tanto por la ruta del retículo endoplásmico (ER) como por la ruta mitocondrial debido a un incremento en los niveles de ERO y productos aldehídicos formados por el catabolismo de los ácidos grasos (Pereira Batista et al, 2014).

En estudios se reporta que el CLA adicionado al medio de CIV, junto con antioxidantes como el GSH y el β - mercaptoetanol, previene la oxidación de los ácidos grasos, disminuye el diámetro de las gotas lipídicas y la deposición citoplasmática de

lípidos e incrementa la calidad de los blastocitos y la supervivencia de los embriones después de la criopreservación (Pereira et al., 2007; Pereira et al, 2008).

Lecitina de Soja

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

La lecitina de soja ha sido empleada con éxito en los medios de crioconservación espermática en especies bovinas (Aires et al., 2003), caprinas (Vidal et al. 2013), equinas (Papa et al., 2011), ovinas (Forouzanfar et al., 2010) y humana (Reed et al, 2009), como sustituto de la yema de huevo en términos de bioseguridad, sin presentar efectos citotóxicos (Bousseau et al., 1998).

No se ha establecido el mecanismo por el cual se protegen los espermatozoides durante la congelación – descongelación, pero se plantean dos posibles mecanismos (Vidal et al., 2013):

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

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

HIPOTESIS

1. La supervivencia de los embriones congelados producidos *in vitro*, aumenta con la adición de EGF y cisteamina en el medio de maduración.
2. Un medio de cultivo secuencial suplementado con Cisteamina, Acido Linoleico y lecitina de soja, aumenta la supervivencia de los embriones congelados producidos *in vitro*.

OBJETIVO GENERAL

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

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Evaluar el efecto de la adición de EGF en el medio de maduración de embriones bovinos *in vitro*, criopreservados mediante congelación lenta con EG (Experimento 1).

Evaluar el efecto de la adición de Cisteamina en el medio de maduración de embriones bovinos *in vitro*, criopreservados mediante congelación lenta con EG (Experimento 2).

Evaluar el efecto de la adición de Cisteamina y de EGF en el medio de maduración de embriones bovinos *in vitro*, criopreservados mediante congelación lenta con EG (Experimento 3).

Evaluar el efecto en la supervivencia de embriones producidos *in vitro* por la adición de cisteamina en el medio de cultivo en los días 3 o 5 (Experimento 4).

Evaluar el efecto en la supervivencia de embriones producidos *in vitro* por la adición de ácido linoleico en el medio de cultivo en los días 3 o 5 (Experimento 5).

Evaluar el efecto en la supervivencia de embriones producidos *in vitro* por la adición de fosfatidilcolina de soja en el medio de cultivo en los días 3 o 5 (Experimento 6).

Evaluar el efecto de la adición de Ácido linoleico, Cisteamina y lecitina en el medio de cultivo de embriones bovinos *in vitro*, criopreservados mediante congelación lenta con EG (Experimento 7).

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS

PRODUCCION *IN VITRO* DE EMBRIONES

OBTENCION Y ACONDICIONAMIENTO DE LOS OVARIOS

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

RECOLECCION Y SELECCIÓN DE LOS COMPLEJOS OVOCITOS – CELULAS DEL CUMULO (COC´s)

Los complejos COC´s se obtuvieron de la punción de folículos de 2 a 13 mm de diámetro empleando jeringas de 5 ml con agujas de calibre 19 G. El fluido folicular obtenido se colocó en tubos Falcon de 50 ml (Falcon, USA). El fluido folicular se dejó reposando hasta la visualización del pellet formado por los COC´s que decantaron, estos se extrajeron con pipeta pasteur y se colocaron en placa de 90 mm (Delta Lab, España), para la búsqueda de los mismos con ayuda de lupa estereoscópica. Los COC´s seleccionados fueron los grados I, II y III (Hasler et al., 1995), y se lavaron en tres gotas de 100 µl de medio TCM – 199 Hank´s (Invitrogen, USA) suplementado con 2, 5 mg/ml de piruvato de sodio (Sigma, USA), 50 µg/ml de gentamicina (Sigma, USA) y 10% de SFB (Invitrogen, USA), el cual fue atemperado previamente a 38.8 °C y luego en una gota de

100 µl de medio MIV (TCM – 199 Earl's (Invitrogen, USA) suplementado con 10 µl/ml de FSH – rh (Gonal-f, Merck, USA), 2,5 mg/ml de piruvato de sodio, 50 µg/ml de gentamicina y 1 % de SFB), equilibrado a 38.8 °C con una atmósfera de 5.5% CO₂.

MADURACION IN VITRO

Los COC's obtenidos fueron cultivados en placas de Petri de 35 mm (Corning, USA) por la metodología de microgota con un volumen de 90 µl de medio MIV y cubiertas con aceite mineral (Sigma, USA), en grupos de máximo 20 COC's por gota, equilibrado a 38,8 °C y con una atmósfera de 5.5 % de CO₂. El tiempo de maduración fue de 24 h.

FERTILIZACION IN VITRO

MANEJO DEL SEMEN

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

Las pajuelas de 0.5 ml, se descongelaron 10 segundos al aire y 30 segundos en baño maría a 37 °C. Para su selección y capacitación se empleó el sistema de gradientes de minipercoll de densidad creciente (45% - 90% v/v), cada columna con un volumen de 200 µl, previamente atemperada a 38.8 °C. El contenido de la pajuela se colocó en la parte superior del gradiente y se realizó una centrifugación a 4000 rpm durante 8 min., el pellet resultante se resuspendió en 1 ml de IVF – SOF, previamente equilibrado a 38.8 °C y atmósfera de CO₂ al 5.5 % y se procedió a una segunda centrifugación a 1200 rpm durante 5 min.

Posteriormente se realizó el conteo de espermatozoides (Spz) en cámara de Neubauer para determinar la concentración espermática, mediante una dilución en agua

de 1/20. Establecida la concentración se procedió a fertilizar los ovocitos con una dosis de 1.5×10^6 spz/ml.

MANEJO DE LOS OVOCITOS

Pasadas 24 h de maduración, los COC's fueron lavados en tres gotas de 100 μ l de IVF – SOF (NaCl: 315 mg, KCl: 26,8 mg, KH_2PO_4 : 2 mg, NaHCO_3 : 105 mg, Penicilina: 3,25 mg, $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3\text{Na}$: 2,75 mg, BSA – FAF: 400 mg, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$: 4,5 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 12, 6 mg, $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Na}$ (Sirupe al 60%): 23,5 μ l y Agua ultrapura cps: 50 ml. Reactivos Sigma, USA) con 50 μ g/ml de heparina (Sigma, USA) y depositados en placas de cultivo de 35 mm (Corning, USA) en microgotas de un volumen de 50 μ l de IVF – SOF y cubiertas con aceite mineral. La co-incubación de los espermatozoides con los COC's fue de 18 – 24 h a 38.8 °C y 5.5% de CO_2 .

CULTIVO EMBRIONARIO IN VITRO

Pasadas las 18 – 24 h del proceso FIV, se procedió a denudar mecánicamente los presuntos cigotos con micropipeta p100 y se lavaron en cuatro gotas de 100 μ l de medio SOF – Citrato (NaCl: 314,5 mg, KCl: 26,5 mg, KH_2PO_4 : 8,1 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 9,1 mg, NaHCO_3 : 105 mg, Gentamicina: 2,5 mg, $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3\text{Na}$: 4 mg, BSA – FAF: 150 mg, BME: 1,5 ml, MEM: 0,5 ml, $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$: 2,5 mg, HEPES libre de ácido: 60 mg, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$: 5 mg, Myo – inositol: 25 mg, HEPES Sal de Sodio: 65 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 13, 1 mg, $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Na}$ (Sirupe al 60%): 15 μ l y Agua ultrapura cps: 50 ml. Reactivos Sigma, USA), sin suplementación con Suero Fetal Bovino (SFB), previamente equilibrado a 38.8 °C y con atmósfera de 5.5 % CO_2 y 7% O_2 .

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

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

CRIOPRESERVACION DE LOS EMBRIONES OBTENIDOS

CONGELAMIENTO

Los blastocitos grado 1, Día 7 del CIV se lavaron en tres gotas de 100 µl de SOF – Citrato para retirar el aceite proveniente de las placas de cultivo, luego se expusieron durante 5 minutos en Etilenglicol 1.5 M (Vigro Ethylene Glycol, Bioniche Animal Health, Pullma, USA), se cargaron 10 embriones por pajueta de 0.25 ml. Las pajuelas cargadas y selladas se pusieron en una congeladora Freeze Control 5500 (Cryologic, Australia) a – 6.5 °C, después de 2 min se realizó el seeding (inducción de la cristalización), y luego de 10 minutos de estabilización se inició la curva de congelamiento a una velocidad de 0.6 °C /min. Al culminar la curva de congelamiento, es decir a los – 35 °C, las pajuelas se almacenaron en un termo con N₂ líquido por un tiempo mínimo de una semana.

DESCONGELAMIENTO

Para evaluar la resistencia de los embriones a la criopreservación, se tomaron las pajuelas almacenadas en N₂ líquido y se descongelaron, sacudiéndolas 10 segundos al aire y 20 segundos en baño maría a 37 °C y se depositaron en una placa de Petri, para luego ser lavados con SOF – Citrato y puestos en CIV en este mismo medio mediante la técnica de microgota, para evaluar a las 24, 48 y 72 h, la re-expansión y eclosión de los embriones cultivados nuevamente.

EXPERIMENTO 1

En este experimento se evaluó el efecto de la adición de EGF en el medio de maduración de embriones bovinos *in vitro*, criopreservados mediante congelación lenta con EG. Para ello se pusieron a madurar aproximadamente 70 COCs viables por tratamiento (seis replicas), necesarios para obtener 100 embriones congelables por grupo (solo Grado 1), este parámetro fue igual para todos los tratamientos de los distintos experimentos. Los COCs fueron colectados y clasificados por la metodología descrita, y se dividieron en tres grupos: **Grupo 1.** Se realizó la adición de 100 ng/ml de Factor de Crecimiento Epidermal en el medio MIV (E9644, Sigma, USA). **Grupo 2.** Adición de 50 ng/ml de EGF en el medio de MIV. Los COCs del tercer grupo (**Control**) fueron madurados en el mismo medio de MIV, pero sin la adición de EGF. A las 24 h de la MIV, se evaluó la maduración ovocitaria mediante la observación de la expansión de las células del cúmulo y por la presencia del primer corpúsculo polar (CPI) en el espacio perivitelino; para ello fue realizado el denudamiento de los COC's en 1 mg/ml de Hialuronidasa (Sigma, USA) en TCM – 199 Hank's atemperado a 38.8 °C, mediante pipeteo mecánico. Además se evaluó el efecto de los tratamientos en el desarrollo embrionario (% clivaje: estructuras con división celular en el Día 3 y % de embriones en el Día 7) y en la supervivencia de blastocitos (evaluación de embriones re – expandidos y eclosionados) criopreservados mediante congelación lenta con EG.

EXPERIMENTO 2

Para evaluar el efecto de la adición de 50 μ M y 100 μ M de Cisteamina en el medio MIV, en el porcentaje de ovocitos en metafase II, en el desarrollo embrionario y en la supervivencia de blastocitos criopreservados mediante congelación, se determinó la maduración ovocitaria, clivaje, producción de blastocitos y supervivencia a la congelación, mediante la misma metodología explicada en el experimento 1. Los COCs fueron colectados y clasificados por la metodología mencionada y se dividieron en 3 grupos: **Grupo 1.** Se realizó la adición de 100 μ M de Cisteamina (M 9768, Sigma, USA) en el medio de MIV. **Grupo 2.** Se realizó la adición de 50 μ M de Cisteamina en el medio

de MIV. Los COCs del tercer grupo (**Control**) fueron madurados en el mismo medio de MIV que los dos primeros grupos, pero sin la adición de Cisteamina.

EXPERIMENTO 3

En este experimento se evaluó el efecto de la adición de 100 ng/ml de EGF y 100 μ M de Cisteamina en el medio de maduración, en el porcentaje de oocitos en metafase II, en el desarrollo embrionario y en la supervivencia de blastocitos criopreservados mediante congelación lenta con EG, empleando la misma metodología empleada en el experimento 1. Los COCs fueron colectados y clasificados para luego ser trabajados por la técnica FIV descrita, y se dividieron en 2 grupos: **Grupo 1**. Se realizó la adición de 100 ng/ml de EGF y de 100 μ M de Cisteamina en el medio de MIV. En el segundo grupo (**Control**), los COCs fueron madurados en el mismo medio de MIV empleado en el grupo 1, pero sin la adición de Cisteamina.

EXPERIMENTO 4

En este experimento se evaluó el efecto de la adición de 100 μ M y 50 μ M de Cisteamina en el medio de cultivo los días 3 o 5, en la producción de embriones, número de blastómeras y en la supervivencia a la congelación. Los COCs fueron colectados y clasificados por la metodología ya descrita, se dividieron en 5 grupos: **Grupo 1**. Se realizó la adición de 100 μ M de Cisteamina en el medio de CIV, en el Día 3. **Grupo 2**. Se realizó la adición de 50 μ M de Cisteamina en el medio de CIV, en el Día 3. **Grupo 3**. Se realizó la adición de 100 μ M de Cisteamina en el medio de CIV, en el Día 5. **Grupo 4**. Se realizó la adición de 50 μ M de Cisteamina en el medio de CIV, en el Día 5. Los COCs del quinto grupo (**Control**) fueron cultivados en el mismo medio de CIV, sin la adición de Cisteamina. En todos los tratamientos de este experimento, los COCs fueron madurados en medio de MIV con adición de 100 ng/ml de EGF y de 100 μ M de Cisteamina.

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

EXPERIMENTO 5

En este experimento se evaluó el efecto de la adición de 50 μ M y 100 μ M de Ácido Linoleico (L1012, Sigma, USA) en el medio de CIV los días 3 o 5, en la producción de embriones, número de blastómeras y en la supervivencia a la congelación. Los COCs fueron colectados y clasificados por la metodología ya mencionada, se dividieron en 5 grupos: **Grupo 1.** Se realizó la adición de 100 μ M de Ácido Linoleico en el medio de CIV, en el Día 3. **Grupo 2.** Se realizó la adición de 50 μ M de Ácido Linoleico en el medio de CIV, en el Día 3. **Grupo 3.** Se realizó la adición de 100 μ M de Ácido Linoleico en el medio de CIV, en el Día 5. **Grupo 4.** Se realizó la adición de 50 μ M de Ácido Linoleico en el medio de CIV, en el Día 5. Los COCs del quinto grupo (**Control**) fueron cultivados en el mismo medio de CIV, sin la adición de Ácido Linoleico. En todos los tratamientos de este experimento, los COCs fueron madurados en medio de MIV con adición de 100 ng/ml de EGF y de 100 μ M de Cisteamina.

EXPERIMENTO 6

En este experimento se evaluó el efecto de la adición de 50 μ M y 100 μ M de L – α - Fosfatidilcolina de soja (P7443, Sigma, USA) en el medio de CIV los días 3 o 5, en

la producción de embriones, número de blastómeras y en la supervivencia a la congelación. Los COCs fueron colectados, clasificados y manejados según la técnica de FIV ya descrita, se dividieron en 5 grupos: **Grupo 1.** Se realizó la adición de 100 μM de Lecitina de Soja en el medio de CIV, en el Día 3. **Grupo 2.** Se realizó la adición de 50 μM de Lecitina de Soja en el medio de CIV, en el Día 3. **Grupo 3.** Se realizó la adición de 100 μM de Lecitina de Soja en el medio de CIV, en el Día 5. **Grupo 4.** Se realizó la adición de 50 μM de Lecitina de Soja en el medio de CIV, en el Día 5. Los COCs del quinto grupo (**Control**) fueron cultivados en el mismo medio de CIV, sin la adición de Lecitina de Soja. En todos los tratamientos de este experimento, los COCs fueron madurados en medio de MIV con adición de 100 ng/ml de EGF y de 100 μM de Cisteamina.

EXPERIMENTO 7

En este experimento se evaluó el efecto de la adición de 50 μM de Ácido linoleico, 100 μM de Cisteamina y 100 μM de fosfatidilcolina de soja en el medio de CIV el día 5, en la producción de embriones, número de blastómeras y en la resistencia tras congelación. Los COCs fueron colectados y clasificados según la metodología descrita, se dividieron en 2 grupos: **Grupo 1.** Se realizó la adición de 50 μM de Ácido linoleico, 100 μM de Cisteamina y 100 μM de fosfatidilcolina de soja en el medio de CIV el día 5. Los COCs del Grupo 2 (**Control**) fueron cultivados en el mismo medio de CIV, sin la adición de estos suplementos. En los tratamientos de este experimento, los COCs fueron madurados en medio de MIV con adición de 100 ng/ml de EGF y de 100 μM de Cisteamina.

ANALISIS ESTADISTICO

Todos los estudios fueron realizados con el análisis estadístico Prueba de Comparaciones de Duncan o Test de Rango Múltiple de Duncan, el cual determina la existencia de diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos sobre las

distintas variables objetivo, comparando la distribución de cada uno de los tratamientos entre sí. Se empleó el software Stata MP – 64. Los resultados se expresaron como porcentajes (%) junto con su Error Estándar (EE).

RESULTADOS

EXPERIMENTO 1

Los resultados de este experimento se muestran en las Tablas 3.1, 3.2 y 3.3, donde se evaluó el efecto de la adición de EGF en el medio de maduración de embriones bovinos *in vitro*, criopreservados mediante congelación lenta con EG. No hubo diferencias significativas de los tratamientos con respecto al grupo control, tanto en el porcentaje de clivaje como en el porcentaje de producción de embriones ($P > 0,05$). El tratamiento de 100 ng/ml de EGF presentó una tendencia a aumentar el porcentaje de estructuras clivadas con respecto al tratamiento de 50 ng/ml ($P = 0,06$). La adición de 50 ng/ml y de 100 ng/ml de EGF al medio MIV, aumentó el porcentaje de ovocitos en metafase II ($P_{50\text{ ng/ml}} = 0,014$ y $P_{100\text{ ng/ml}} = 0,001$). La adición de EGF al medio de MIV no afectó la supervivencia embrionaria a la congelación, con respecto al control ($P > 0,2$). Aunque aparentemente la adición de EGF al medio MIV en concentración de 100 ng/ml, resultó en un porcentaje numéricamente mayor de embriones eclosionados, no se encontró diferencia significativa con respecto al control ($P = 0,55$).

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

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

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

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

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

^{ab} Porcentajes en la misma columna con diferente superíndice, indica diferencia significativa (P < 0,05).

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

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

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

EXPERIMENTO 2

Los resultados de este experimento se indican en las Tablas 3.4, 3.4 y 3.6, donde se evaluó el efecto de la adición de Cisteamina en el medio de maduración de embriones bovinos *in vitro*, criopreservados mediante congelación lenta con EG. No se presentaron diferencias significativas de los tratamientos con respecto al grupo control, tanto en el porcentaje de clivaje como en el porcentaje de producción de embriones (P > 0,05). Con la adición de 100 µM de Cisteamina al medio MIV, se observó un mayor porcentaje de ovocitos en metafase II (P = 0,032); mientras que con 50 µM no hubo diferencia

significativa ($P = 0,321$). El tratamiento con $100 \mu\text{M}$ de Cisteamina presentó una tendencia a producir un mayor número de embriones re – expandidos ($P = 0,08$), aunque no influyó en el porcentaje de embriones eclosionados ($P > 0,05$).

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

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

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

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

GRUPO	OVOCITOS (n)	CPI (%)
CONTROL	253	$72,3 \pm 3,8^a$
CISTEAMINA 100	268	$80,0 \pm 6,5^b$
CISTEAMINA 50	243	$75,4 \pm 8,0^a$

^{ab} Porcentajes en la misma columna con diferente superíndice, indica diferencia significativa ($P < 0,05$).

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

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

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

EXPERIMENTO 3

Los resultados de este experimento se muestran en las Tablas 3.7, 3.8 y 3.9, donde se evaluó el efecto de la adición de Cisteamina y de EGF en el medio de maduración de embriones bovinos *in vitro*, criopreservados mediante congelación lenta con EG. Hubo diferencia significativa tanto en el porcentaje de clivaje ($P = 0,001$) como en el porcentaje de producción de embriones ($P = 0,001$) con respecto al grupo control. Se presentó diferencia significativa en el número de ovocitos con extrusión del primer cuerpo polar ($P = 0,02$). No hubo diferencias significativas en el porcentaje de embriones eclosionados ($P = 0,125$).

Tabla 3.7. Porcentaje de Producción de Embriones tratados con 100 μ M de Cisteamina y 100 ng/ml de EGF en el medio MIV.

GRUPO	OVOCITOS (n)	CLIVAJE (%)	EMBRIONES (%)
CONTROL	408	52,0 ± 6,6 ^a	23,8 ± 2,4 ^a
EGF + CIST.	358	69,5 ± 7,1 ^b	32,1 ± 4,0 ^b

^{ab} Porcentajes en la misma columna con diferente superíndice, indica diferencia significativa ($P < 0,05$).

Tabla 3.8. Extrusión de Primer Cuerpo Polar de ovocitos madurados con 100 μ M de Cisteamina y 100 ng/ml de EGF.

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

^{ab} Porcentajes en la misma columna con diferente superíndice, indica diferencia significativa ($P < 0.05$).

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

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

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

EXPERIMENTO 4

Los resultados del Experimento 4 se muestran en las Tablas 3.10 y 3.11 y en las Figuras 3.1 y 3.2, donde se evaluó el efecto en la supervivencia de embriones producidos *in vitro* por la adición de cisteamina en el medio de cultivo en Día 3 o Día 5. Los resultados mostraron que la adición de Cisteamina en el medio de CIV no influyó sobre el porcentaje de clivaje, ya que no hubo diferencia significativa en los tratamientos y días estudiados con respecto al grupo control ($P < 0,05$). Mientras que la producción embrionaria fue afectada al adicionarse en Día 3, observándose una tendencia a la disminución en la cantidad de blastocitos tanto en la concentración de 100 μ M ($P = 0,06$) como en la de 50 μ M ($P = 0,1$). Al suplementar con 100 μ M ($P = 0,001$) en Día 5 del CIV, se observó un efecto positivo en la producción de blastocitos, al aumentar el

porcentaje de producción de embriones con respecto al grupo control. Al comparar los tratamientos entre sí, con respecto al porcentaje de producción de embriones, se encontró diferencia significativa en los siguientes grupos: 100 μ M Día 5 vs. 100 μ M Día 3 ($P = 0,001$), 100 μ M Día 5 vs. 50 μ M Día 3 ($P = 0,001$) y 50 μ M Día 5 vs. 100 μ M Día 5 ($P = 0,001$), mientras se mostró una tendencia numérica en 50 μ M Día 5 vs. 50 μ M Día 3 ($P = 0,09$).

La supervivencia al proceso de congelado descongelado se evaluó a las 24 y 72 h pos descongelado mediante la re-expansión y eclosión de los embriones cultivados nuevamente. La adición de Cisteamina en los días y concentraciones propuestas no mostró diferencia significativa en la re-expansión de los embriones descongelados; pero si favoreció la eclosión al ser adicionada en el Día 5 con respecto al grupo control, tanto en la concentración de 50 μ M ($P = 0,04$) como en la de 100 μ M ($P = 0,01$). La evaluación del número de blastómeras por embrión de cada uno de los tratamientos mostró que la adición de Cisteamina en el medio de CIV, no afectó el número de blastómeras con respecto al grupo control, ya que no hubo diferencias significativas.

Tabla 3.10. Porcentaje de Producción de Embriones obtenidos con la adición de Cisteamina en el medio CIV en Día 3 o Día 5.

GRUPO		OOCITOS	CLIVAJE	EMBRIONES
		(n)	(%)	(%)
	CONTROL	365	58,9 ± 16,9	32,5 ± 15,7 ^{a**}
D3	CISTEAMINA 100	513	63,1 ± 14,6	21,3 ± 10,1 ^{a*}
	CISTEAMINA 50	515	63,2 ± 17,3	22,3 ± 11,4 ^{a*}
D5	CISTEAMINA 100	189	71,0 ± 9,2	58,8 ± 8,4 ^b
	CISTEAMINA 50	345	61,2 ± 8,6	33,8 ± 12,8 ^a

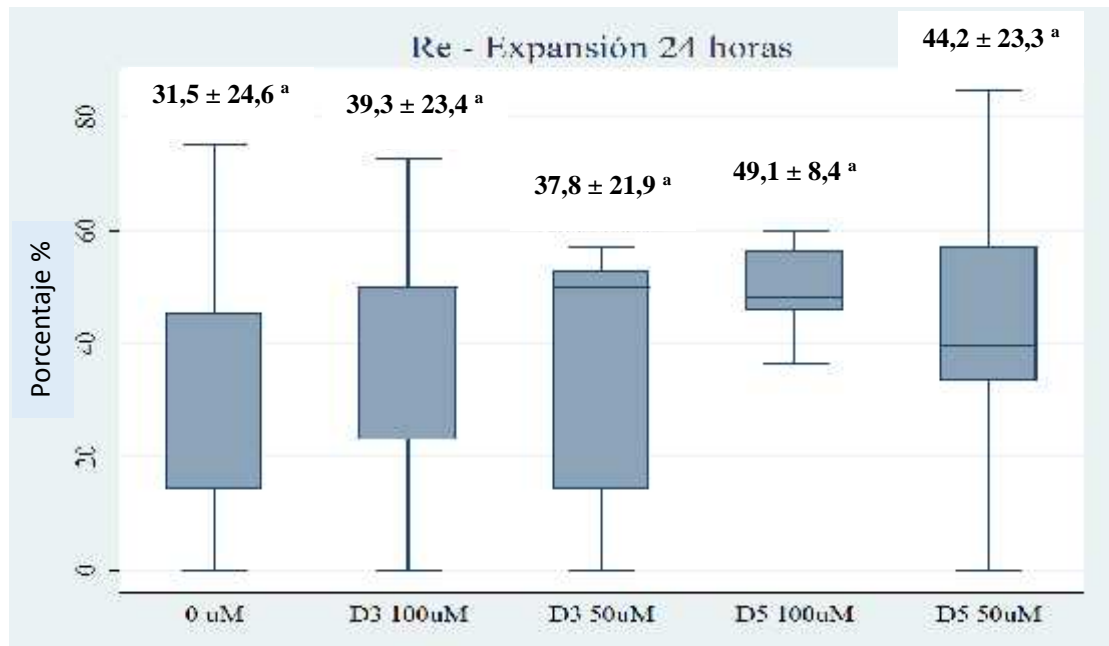
^{ab} Porcentajes en la misma columna con diferente superíndice, indica diferencia significativa ($P < 0,05$). Porcentajes con asterisco (*) indican tendencia numérica ($P = 0,1$).

Tabla 3.11. Número de células de embriones tratados con Cisteamina en el medio CIV en Día 3 o Día 5.

GRUPO		EMB (n)	No. TOTAL CEL.
	CONTROL	15	159,9 ± 34,2
D3 CIST.	100	15	159,2 ± 30,9
	50	15	156,9 ± 23,5
D5 CIST.	100	15	161,1 ± 23,8
	50	15	160,0 ± 32,4

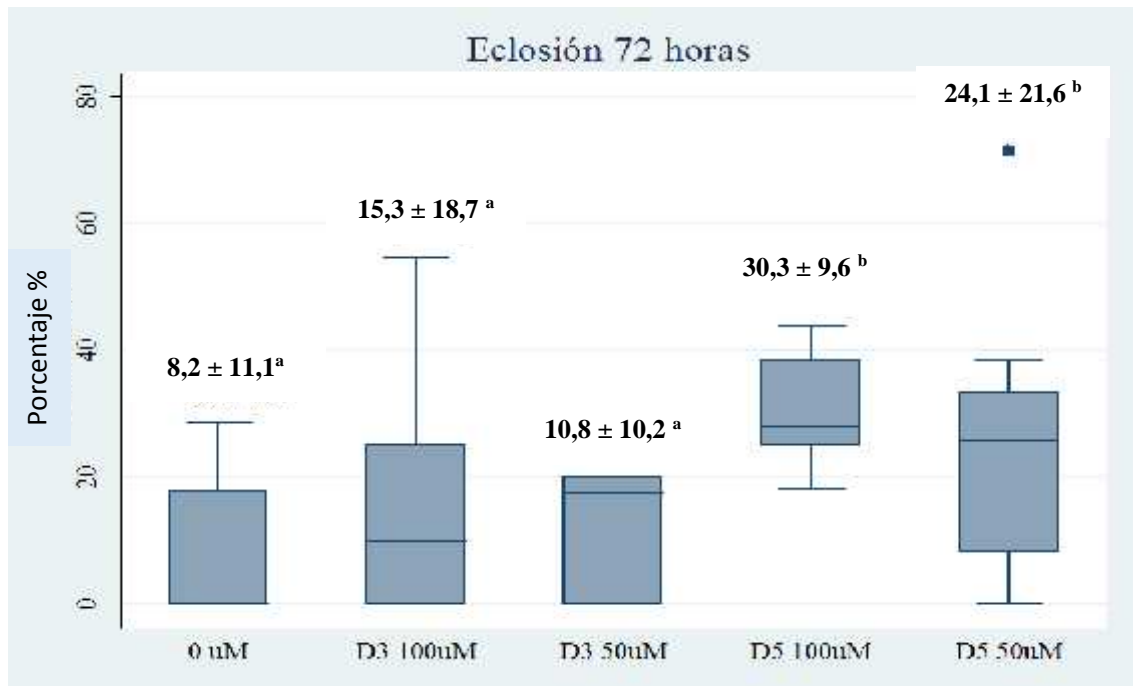
Los porcentajes no difieren significativamente ($P > 0,05$).

Figura 3.1. Diagrama de Box de re – expansión a las 24 hs. de embriones tratados con cisteamina en el medio CIV en Día 3 o Día 5.



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

Figura 3.2. Diagrama de Box de eclosión a las 72 hs. de embriones tratados con cisteamina en el medio CIV en Día 3 o Día 5.



^{ab} Porcentajes con diferente superíndice diferencia significativa ($P < 0,05$).

EXPERIMENTO 5

Los resultados de este experimento se indican en las Tablas 3.12 y 3.13 y en las Figuras 3.3 y 3.4, donde se evaluó el efecto en la supervivencia de embriones producidos *in vitro* por la adición de ácido linoleico en el medio de cultivo en Día 3 o Día 5. El Ácido linoleico adicionado al medio CIV en el Día 3, favoreció el desarrollo embrionario, ya que la adición de 100 μM mostró una tendencia a aumentar el porcentaje de estructuras clivadas ($P = 0,05$) y en la concentración de 50 μM se presentó un aumento significativo en el porcentaje de clivaje ($P = 0,04$). En cuanto al porcentaje de embriones, el ácido linoleico fue favorable en concentración de 100 μM ($P = 0,02$) y de 50 μM ($P = 0,049$), ya que hubo diferencia significativa al aumentar el porcentaje de embriones.

La adición de ácido linoleico influyó en la supervivencia embrionaria post congelado descongelado, tanto en la re-expansión como en la eclosión. A las 24 hs, se observó una tendencia favorable a la re-expansión de los embriones en Día 3 tanto con 100 μM ($P = 0,06$) como en 50 μM ($P = 0,08$); mientras que en Día 5, con 100 μM presentó una tendencia al aumento de embriones recuperados luego de descongelación ($P = 0,05$), y con 50 μM hubo diferencia significativa con respecto al control ($P = 0,002$). La evaluación a las 72 hs. benefició la eclosión en los días y concentraciones propuestas, ya que hubo diferencia significativa ($P < 0,03$). Cuando se comparó el número de células de los embriones del experimento, los resultados mostraron que la adición de Ácido Linoleico como suplemento en el medio de CIV, no afectó el número de células ($P > 0,05$).

Tabla 3.12. Porcentaje de Producción de Embriones con adición de Ácido Linoleico en el medio CIV.

GRUPO		OOCITOS	CLIVAJE	EMBRIONES
		(n)	(%)	(%)
CONTROL		355	45,9 ± 33,7 ^{a**}	25,6 ± 19,6 ^a
D3	AL 100	250	72,7 ± 19,5 ^{a*}	48,0 ± 24,4 ^b
	AL 50	250	79,3 ± 17,5 ^b	48,2 ± 23,5 ^b
D5	AL 100	264	64,9 ± 14,6 ^a	38,0 ± 9,6 ^a
	AL 50	333	65,7 ± 16,2 ^a	35,8 ± 10,7 ^a

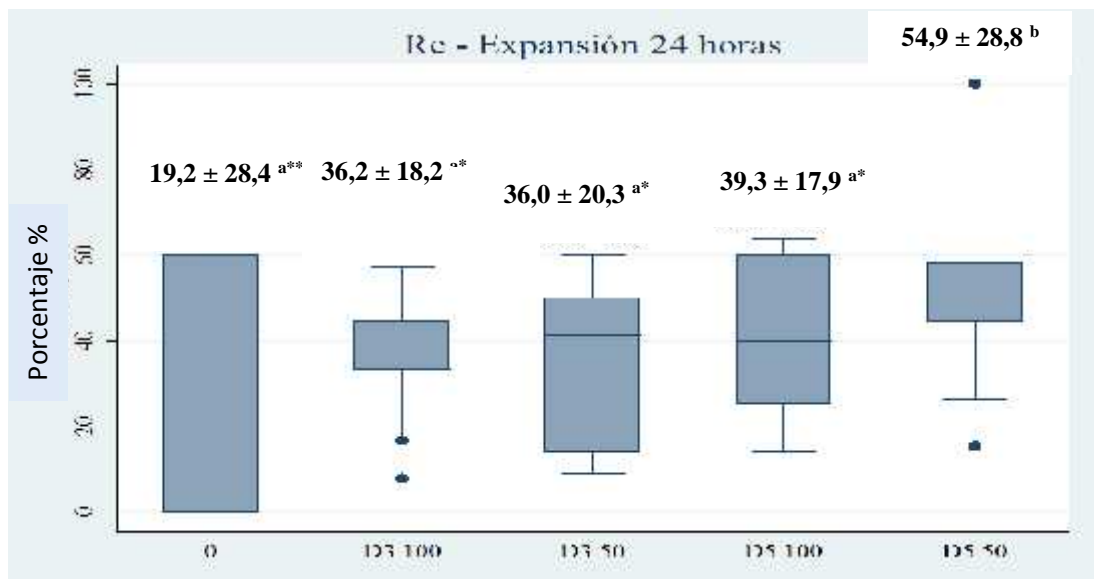
^{ab} Porcentajes en la misma columna con diferente superíndice, indica diferencia significativa ($P < 0,05$). Porcentajes con asterisco (*) indican tendencia numérica ($P > 0,1$).

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

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

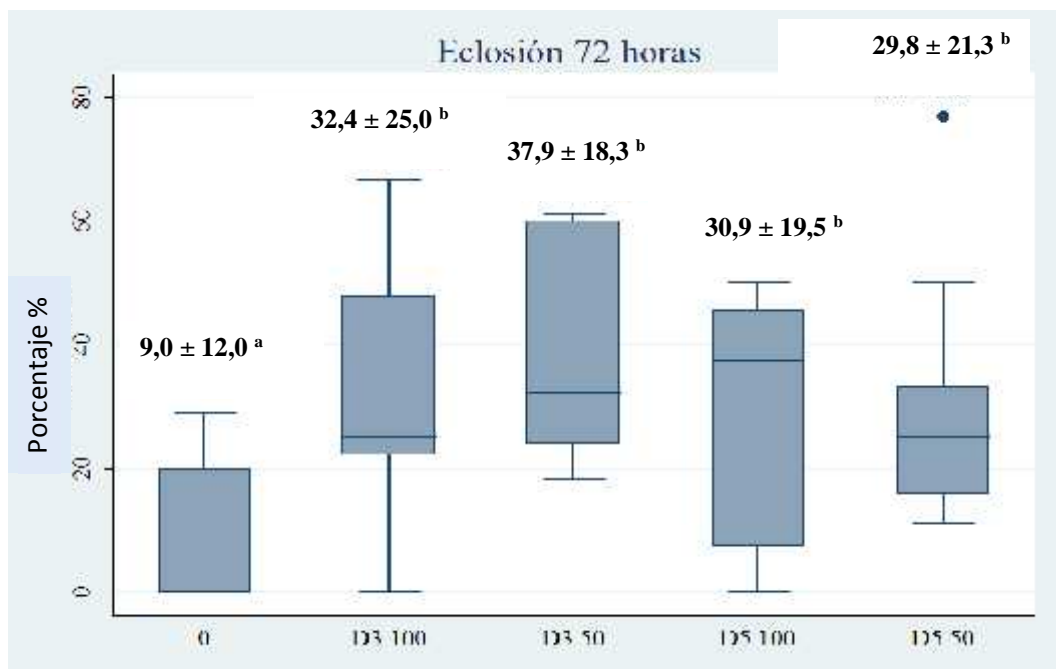
Los porcentajes no difieren significativamente ($P > 0,05$).

Figura 3.3. Diagrama de Box de re – expansión a las 24 hs. de embriones tratados con Ácido linoleico en el medio CIV en Día 3 o Día 5.



^{ab} Porcentajes con diferente superíndice, indica diferencia significativa ($P < 0,05$). Porcentajes con asterisco (*) indican tendencia numérica ($P = 0,1$).

Figura 3.4. Diagrama de Box de eclosión a las 72 hs. de embriones tratados con Ácido Linoleico en el medio CIV en Día 3 o Día 5.



^{ab} Porcentajes con diferente superíndice indica diferencia significativa ($p < 0,05$).

EXPERIMENTO 6

Los resultados de este experimento se muestran en las Tablas 3.14 y 3.15 y en las Figuras 3.5 y 3.6, donde se evaluó el efecto en la supervivencia de embriones producidos *in vitro* por la adición de 50 μM o 100 μM de Fosfatidilcolina de soja en el medio de cultivo en Día 3 o Día 5. La adición de Fosfatidilcolina de Soja no influyó sobre el desarrollo embrionario, supervivencia embrionaria a la congelación y el número de células, ya que no hubo diferencia significativa entre los tratamientos ($P > 0,05$).

Tabla 3.14. Producción de Embriones con adición de Fosfatidilcolina de soja en el medio CIV en Día 3 o Día 5.

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

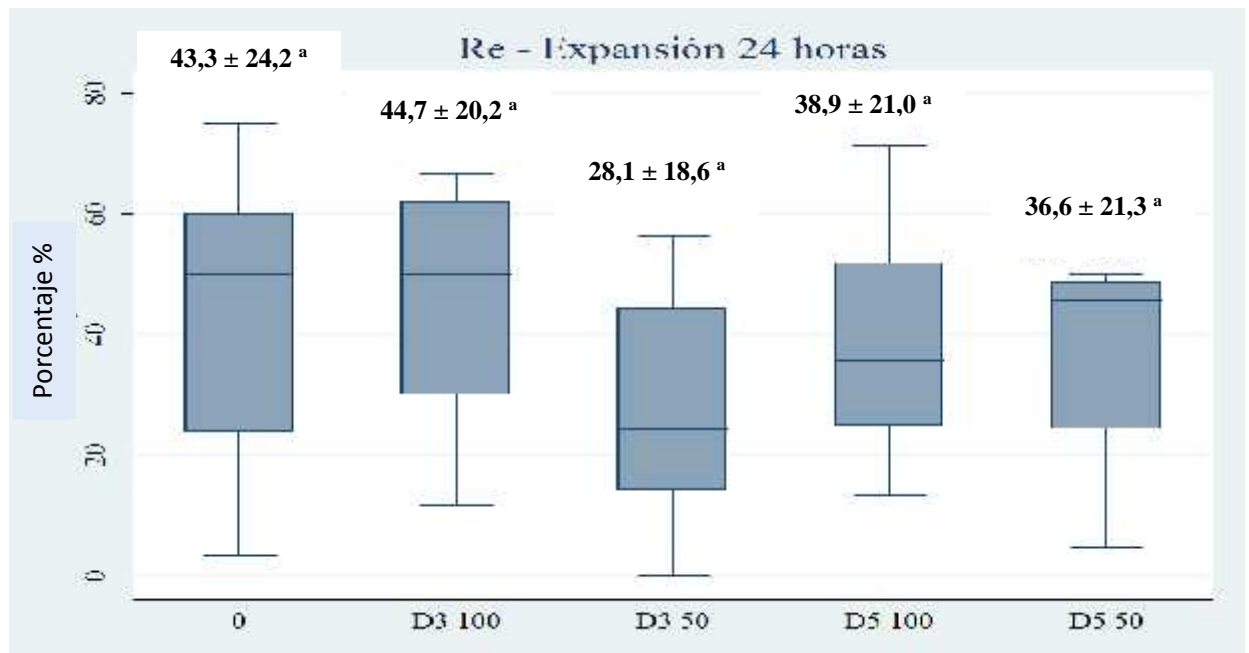
Los porcentajes no difieren significativamente ($P > 0,05$).

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

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

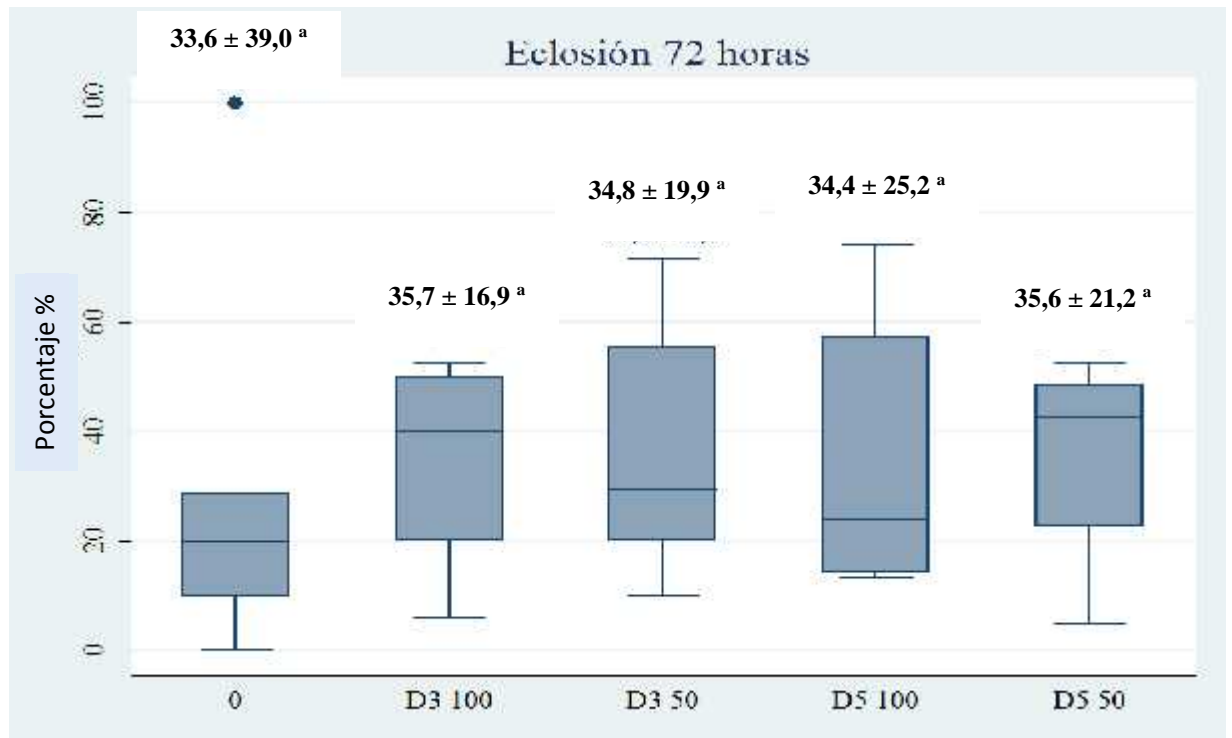
Los porcentajes no difieren significativamente ($P > 0,05$).

Figura 3.5. Diagrama de Box de re – expansión a las 24 hs. de embriones tratados con Fosfatidilcolina de soja en el medio CIV en Día 3 o Día 5.



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

Figura 3.6. Diagrama de Box de eclosión a las 72 hs. de embriones tratados con Fosfatidilcolina de soja en el medio CIV en Día 3 o Día 5.



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

EXPERIMENTO 7

Los resultados de este experimento se pueden observar en las Tablas 3.16 y 3.17 y en las Figuras 3.7 y 3.8, en donde se evaluó la interacción de la suplementación con 100 μM de Cisteamina, 50 μM de Ácido Linoleico y 100 μM de Fosfatidilcolina de soja en el medio CIV en Día 5. La adición de estos aditivos no afectó el desarrollo embrionario, la supervivencia embrionaria a la congelación y el número de células, ya que no se presentó diferencia significativa con respecto al control ($P > 0,05$).

Tabla 3.16. Producción de Embriones con adición de Cisteamina, Ácido Linoleico y Fosfatidilcolina de soja en el medio CIV en Día 5.

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

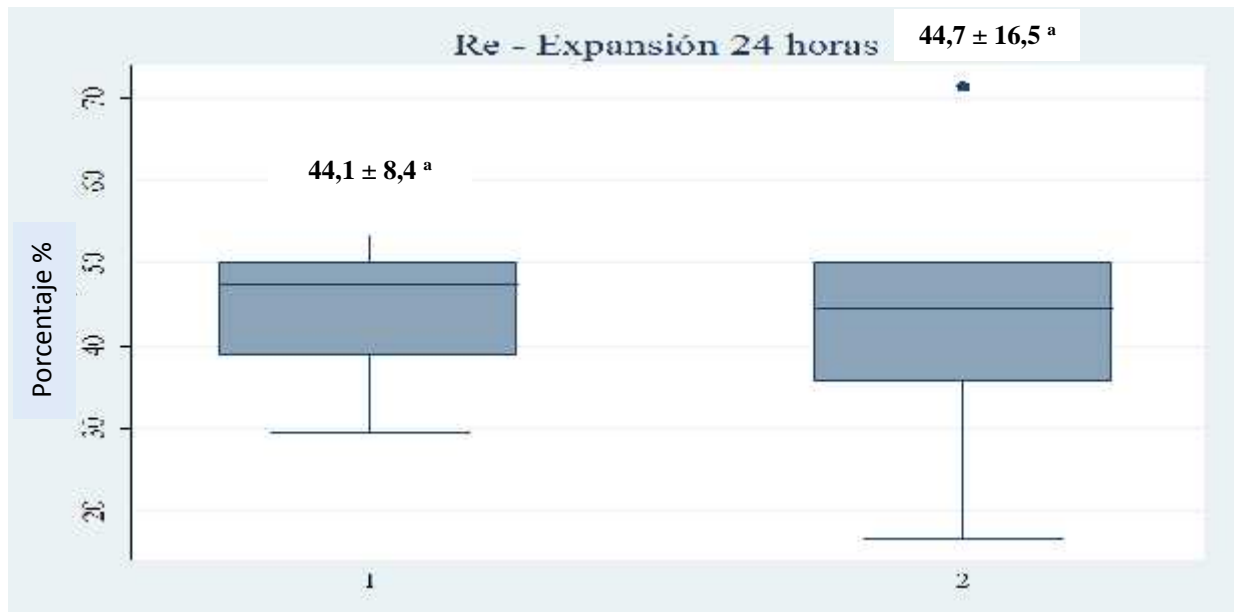
Los porcentajes no difieren significativamente ($P > 0,05$).

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

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

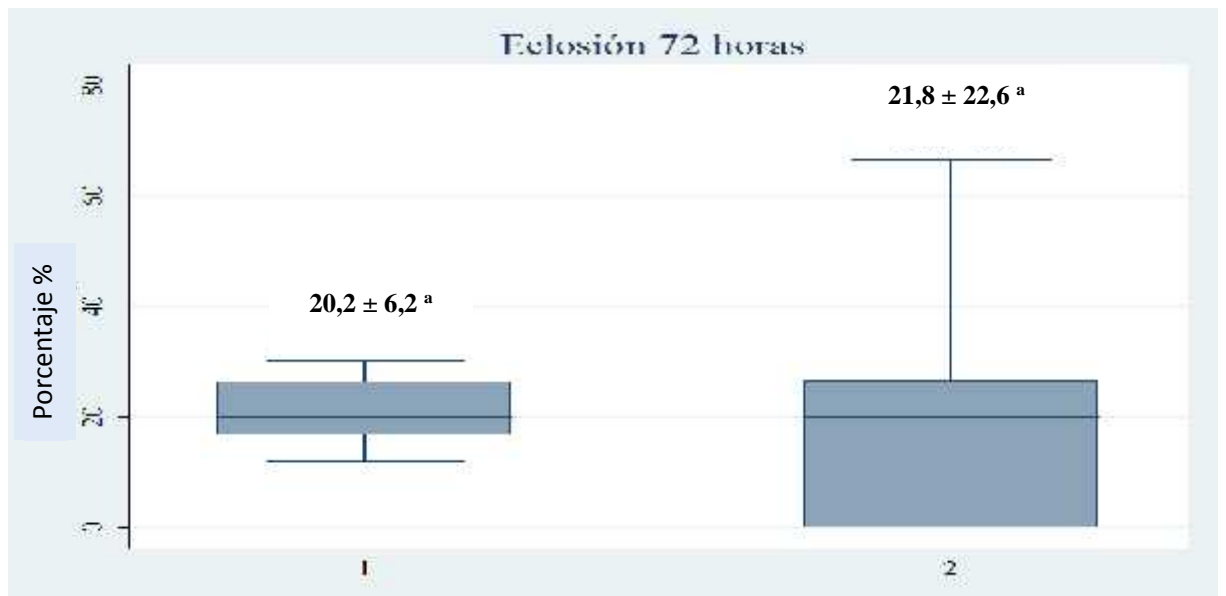
Los porcentajes no difieren significativamente ($P > 0,05$).

Figura 3.7. Diagrama de Box de re – expansión a las 24 hs. de embriones tratados con Cist. + AL + LS en el medio CIV en Día 5.



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

Figura 3.8. Diagrama de Box de eclosión a las 72 hs. de embriones tratados con Cist. + AL + LS en el medio CIV en Día 5.



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

DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis no confirman las hipótesis planteadas. En el experimento 1, se observó que la adición de EGF al medio de MIV en concentración de 100 y 50 ng/ml favoreció la extrusión de CPI con respecto al control, lo cual es reportado en diversos estudios que han demostrado el efecto benéfico de la adición de EGF al medio de maduración, al favorecer la expansión de las células del cúmulo y favorecer la maduración ovocitaria (Rieger et al., 1998; Hernández-Fonseca et al., 2004). Esto se podría sustentar en que el EGF trabaja directamente sobre las células del cúmulo, ya que se han localizado receptores de este factor de crecimiento en estas mismas y en las células de la granulosa de varias especies, incluida la bovina (Yoshida et al., 1998; Qu et al., 2000). De esta manera, el EGF estimularía la síntesis de ácido hialurónico, que podría interactuar con componentes específicos de la matriz celular (Tirone et al., 1997), mejorando significativamente la maduración citoplásmica y nuclear de los ovocitos (Lonergan et al., 1996; Guler et al., 2000; Grazul – Bilaska et al., 2003; Oyamada, 2004 b; Purohi et al., 2005) y participando en la regulación de la expresión genética, en la proliferación y diferenciación celular.

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

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

En este experimento la adición de EGF no influyó en la supervivencia embrionaria post-descongelación, aunque con la concentración de 100 ng/ml se presentó un leve aumento tanto en el porcentaje de re-expansión como en el de eclosión con respecto al control, este experimento se realizó con adición de SFB en el medio MIV. Este resultado podría estar influenciado por la presencia de SFB en el medio de MIV, ya que Saeki et al. (1991) plantearon que no se requiere de la presencia de suero para la MIV bovina. Este resultado fue comprobado por Park and Lin (1993), quienes observaron que la tasa de división de ovocitos bovinos madurados fue más efectiva con suplementación de EGF y BSA que con SFC. La suplementación con suero siempre ha estado relacionada con la acumulación anormal de lípidos a nivel citoplasmático en los embriones bovinos producidos por FIV, lo cual es asociado a su sensibilidad a los procesos de criopreservación (Mucci et al., 2006). Nömm et al. (2015) establecieron que es posible tener un sistema PIV libre de suero y suplementado con EGF, con resultados de supervivencia a la congelación lenta mayores que el de los embriones obtenidos a partir de medios de MIV convencional, pero propuso que hay que realizar más estudios al respecto. Abeydeera et al. (2000), por su parte reportaron que la adición de EGF en un medio de MIV libre de proteína estimuló significativamente la síntesis de GSH en ovocitos porcinos.

La adición de Cisteamina en el medio de MIV (Experimento 2) no afectó el desarrollo embrionario, a pesar de que aparentemente aumentó el porcentaje de embriones con

respecto al control. Silva et al. (2010), reportaron que los porcentajes de clivaje y producción embrionaria fueron similares al suplementar el medio de maduración con 150 μ M de Cisteamina con respecto al control (Clivaje: 86% vs. 89%, % Blast.: 29% vs. 31%), lo cual coincidió con este trabajo. Esto podría ser a causa de que los ovocitos permanecieron durante la MIV en condiciones de bajo metabolismo de Glutación (GSH) intracelular (Rieger et al, 1992; De Matos et al, 1995), ya que 24 h no sería tiempo suficiente para comprometer el desarrollo posterior. También existe la posibilidad que el medio con suplemento proteico pueda inhibir la acción de los antioxidantes (Li et al., 1993). Pavao, (2009), afirmó que la acción de la Cisteamina en el medio de MIV, varía de acuerdo a las condiciones de incubación, específicamente al suplementar este medio con SFB o BSA, influyendo de este modo en el proceso PIVE y en la viabilidad de los embriones ovinos.

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

Merton et al. (2013), reportaron que la presencia de Cisteamina durante la MIV incrementó significativamente la tasa de producción embrionaria a partir de ovocitos obtenidos de ovarios de frigorífico. El aumento numérico en la producción embrionaria pudo deberse a un aumento en la concentración de GSH intracelular después de la inducción de su síntesis con componentes tiol (De Matos et al., 2000). Oyamada (2004 a), informó que la adición de compuestos tiol como Cisteína, β - mercaptoetanol y cisteamina al medio de maduración promueve la síntesis de GSH en el ovocito. La GSH es sintetizada y degradada por la α - glutamilciclase y su biosíntesis depende de la disponibilidad de cisteína en el medio. Sin embargo la Cisteína es inestable en el medio

y se oxida fácilmente a Cistina. La Cisteamina en medio de cultivo puede reducir la Cistina a Cisteína, promoviendo la absorción de Cisteína y mejorando la síntesis de GSH y permitiendo plantear que su adición incrementa la eficiencia del medio de maduración (Nagai, 2001). Varios informes demostraron mejoras después de la adición de antioxidantes en el medio de MIV (De Matos et al., 2000; De Matos et al., 2002), mientras otros dicen que no influyó en la tasas de división y desarrollo embrionario (Ali et al., 2003), aunque sí reportaron aumento de GSH intracelular. Rocha – Frigoni et al. (2012 b), reportaron que la suplementación con antioxidantes en el medio de maduración redujo los niveles intracelulares de ERO y la tasa de apoptosis, pero no aumentó significativamente el desarrollo embrionario, entonces los resultados de la adición de antioxidantes al medio MIV son contradictorios.

En nuestro experimento se evidencia que al adicionar Cisteamina a 100 μM hay diferencia significativa en el % CPI con respecto al control, sugiriendo que esta concentración podría beneficiar el proceso de maduración nuclear.

La adición de Cisteamina en el medio MIV no afectó la supervivencia embrionaria post-descongelación, aunque en concentración de 100 μM se presentó una tendencia a mejorar la re-expansión de los embriones descongelados con respecto al control, lo cual es coincidente con lo reportado por Rocha-Frigoni et al., (2012 b). Estos autores sugirieron que la adición de antioxidantes al medio MIV no aumentó la supervivencia post-vitrificación, al igual que Merton et al. (2013), que informaron que la presencia de Cisteamina durante la MIV no afectó la criotolerancia.

En el tercer experimento se evaluó la adición de 100 ng/ml de EGF y de 100 μM de Cisteamina, en el medio de maduración; ya que los resultados del Experimento 1 mostraron que aunque no hubo diferencias significativas entre los grupos, hubo una diferencia numérica a favor del grupo tratado con 100 ng/ml de EGF en los porcentajes de maduración, producción de embriones y eclosión; además influyó en el porcentaje de extrusión de CPI de los ovocitos. Por lo cual se decidió continuar evaluando esta

concentración de EGF. Entre tanto, en el experimento 2 los resultados mostraron una diferencia significativa a favor del tratamiento con 100 μM de Cisteamina en el porcentaje de extrusión de Primer Cuerpo Polar de los ovocitos. Por este motivo se decide evaluar la adición de 100 μM de Cisteamina y 100 ng/ml de EGF en el medio MIV.

En el Experimento 3, se observó que la suplementación de estos dos aditivos al medio MIV, favoreció el desarrollo embrionario al aumentar el porcentaje de estructuras clivadas y el porcentaje de embriones respecto al grupo control. Oyamada and Fukui (2004 a), reportaron que la adición de 10 ng/ml de EGF y 100 μM de Cisteamina en el medio de maduración incrementó significativamente la proporción de ovocitos clivados respecto al control y la frecuencia de desarrollo de blastocitos, lo cual es coincidente con lo encontrado en este experimento. Aunque estos autores reportaron que no hay un efecto significativo sobre la maduración nuclear, en este experimento sí se presentó con respecto al control. Se hipotetiza que la adición de Cisteamina al medio MIV incrementa la eficiencia de dicho medio y que la adición de EGF podría incrementar el contenido intracelular de GSH en ovocitos porcinos (Oyamada, 2004 a; Prochazka et al., 2000); sin embargo esto no ha sido reportado en bovinos.

Oyamada and Fukui (2004 a), reportaron un aumento significativo en la supervivencia de los embriones post – vitrificados, cuando los ovocitos fueron puestos a madurar en un sistema de cultivo individual en medio mSOFaa + PVA y suplementado con Cisteamina y EGF al ser comparado con medio TCM suplementado con 10% SFB, al parecer la presencia de un compuesto proteico pudo estar influyendo en el resultado obtenido.

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

- El GSH aportado por la Cisteamina, al ser un factor intracelular del ovocito de importancia en la maduración citoplasmática, lo protege de los efectos tóxicos generados por los ERO en las condiciones convencionales de 5% de CO_2 al mantener un ambiente de óxido – reducción adecuado y al reducir los puentes

disulfuro de la protamina de la cabeza espermática favoreciendo la formación de PNM (Pronúcleo Masculino) (Meister, 1976; Meister, 1979).

- El EGF estimula en los COC's la producción de ácido hialurónico y su retención dentro de la matriz intracelular de los cúmulos expandidos, teniendo un efecto positivo en la monoespermia (Prochazka et al., 2000) y por ende en el desarrollo embrionario.

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

Los cigotos y embriones son más frágiles a sufrir daño oxidativo al ser expuestos a factores externos, como condiciones inapropiadas de cultivo. La síntesis de novo de GSH sucede en el estadio de 9 a 16 células en la vaca (Rausell, 2005). La tolerancia de los embriones a un estrés oxidativo difiere a lo largo de los distintos estadios de desarrollo embrionario, es por esto que se estudió la suplementación del medio CIV con Cisteamina en Día 3 o Día 5, ya que es conocida la acción de este agente reductor, al incrementar el nivel intracelular de GSH y el potencial de desarrollo embrionario. En el experimento 4, se observó que aunque la adición de Cisteamina en las concentraciones propuestas en el Día 3 no afectó el clivaje, sí se presentó una tendencia a la disminución del porcentaje de embriones. Estos resultados son coincidentes con lo informado por Merton et al., (2013), quienes reportaron que al adicionar Cisteamina 0.1 mM en el medio MIV y 0.01, 0.05 y 0.1 mM en el medio CIV a partir de los días 1 al 4 del cultivo, la tasa de producción de blastocitos se vio afectada negativamente, más no afectó las tasas de clivaje. Esto pudo ser debido a que las concentraciones propuestas no son suficientes, ya que como es sabido los embriones de mamíferos tienden a sufrir bloqueo del desarrollo embrionario en

condiciones *in vitro*. En este bloqueo se activa la expresión del genoma embrionario, influenciado por las variaciones en el nivel endógeno de hidroxidación lipídica, en la capacidad para quelar metales de transición y en la actividad antioxidante, que determinan si el embrión prosigue con su desarrollo normal (Rausell, 2005). De Matos et al. (2002 b), encontraron que al suplementar con Cisteamina durante la MIV y en los Días 2 a 4 de CIV, la producción de embriones fue óptima en concentración de 0,05 mM (Merton et al., 2013) lo cual no es coincidente con los resultados de Merton y de este trabajo. Esto podría sustentarse en que la adición de Cisteamina en la MIV y con embriones cultivados en atmosfera de O₂, el nivel de GSH ya es el óptimo durante el desarrollo embrionario temprano, especulándose que la suplementación con Cisteamina adicional durante los primeros días de CIV pudo dar lugar a un nivel limitado de ERO, consecuentemente este desequilibrio interfirió con la activación del genoma embrionario durante la transición del control maternal al cigótico (Merton et al., 2013).

En este trabajo la adición de 100 µM de Cisteamina en Día 5, favoreció la producción de embriones, esto se podría fundamentar en que los niveles más altos de GSH se presentan cuando se está acercando a la etapa de blastocito. La Cisteamina estaría contribuyendo probablemente a disminuir la cantidad de ERO y a aumentar la concentración intracelular de GSH, lo cual mejora el desarrollo embrionario. Silva et al., (2010), reportaron que la adición de Cisteamina en concentración 150 µM tanto en el medio de maduración como en el de cultivo, mejoró la producción de embriones. En el blastocito, el peróxido de Hidrógeno, presente en el fluido del blastocito, tiene un rol importante en la diferenciación, provocando la apoptosis de las células del pre – trofoectodermo. Mientras estas células pierden la capacidad de sintetizar GSH, las otras células embrionarias sintetizan GSH protegiéndose de los efectos oxidativos del H₂O₂, en conclusión la mayor reducción del contenido de GSH coincide con la activación del genoma embrionario. Los estadios de desarrollo embrionario previas al blastocito son más sensibles a los efectos nocivos que disminuyen el contenido de GSH (Rausell, 2005). En un estudio se reportó que al suplementar el medio de CIV con 1mM de GSH se favoreció el desarrollo embrionario; sin embargo los efectos benéficos de esta suplementación es variable (Rausell, 2005).

La adición de Cisteamina en CIV no afectó el número total de células por embrión, esto coincide con lo reportado por Rocha – Fragoni et al. (2014) quien informó que la adición de antioxidantes intracelulares (Cisteína y β – mercaptoetanol) y extracelulares (Catalasa) en diferentes etapas de producción (MIV y CIV) no afectó el número total de blastómeras.

La adición de Cisteamina en las concentraciones propuestas en Día 5 favoreció el porcentaje de eclosión. De Matos et al. (2002 b), reportaron que con la adición de Cisteamina tanto en MIV como en CIV, la supervivencia embrionaria después de descongelación se vio favorecida, esto sustentado en el aumento de GSH intracelular. Entre tanto, Rocha – Fragoni et al, (2014), demostraron que la suplementación con antioxidantes durante MIV y/o CIV no incrementó la supervivencia después de vitrificación, aunque si redujo los ERO intracelulares y la tasa de apoptosis. La adición de antioxidantes en el medio CIV da resultados contradictorios; algunos autores no reportan efectos, mientras que otros sí (Iwata et al., 1998; De Matos et al, 2002 b; Ali et al., 2003), y otros reportan efectos desfavorables (Van Soom et al., 2002).

En el experimento 5, la suplementación con ácido linoleico favoreció el porcentaje de clivaje en Día 3 con 50 μ M, el porcentaje de embriones en Día 3 con 100 μ M, y la supervivencia tras descongelación en Día 5 con 50 μ M, más no afectó el número de blastómeras en ningún día y concentración.

Imai et al., (1997), reportaron que el ácido linoleico-albumina al ser adicionado en el medio CIV presentó efectos favorables en la supervivencia de embriones bovinos después de congelación. Esto pudo ser atribuido al incremento en la fluidez de la membrana, debido a la incorporación directa del ALA en la bicapa lipídica y depleción del colesterol de membrana. Bailey et al., (2015) reportaron que la disminución en la criotolerancia de ovocitos y embriones se asoció con un mayor contenido de lípidos citoplasmáticos. Estudios previos en vacas han demostrado que la modificación nutricional inducida de los componentes foliculares, identificando el trans – 10, cis – 12 ácido linoleico conjugado

(CLA) como un potente inhibidor de la síntesis de grasa en la leche en vacas lactantes y su inclusión en el medio de cultivo mejora la supervivencia del embrión después de la descongelación (Bailey et al., 2015). Pereira Batista et al., (2014) reportaron también sensibilidad al congelado de embriones de Bos Indicus y sus cruces, debido a la acumulación de lípidos neutros en el citoplasma. Además, informaron que el cultivo de cigotos en CR2aa con 100 m/L de CLA no tuvo efecto sobre las tasas de clivaje, producción embrionaria y en los niveles de genes m – RNA relacionados con el estrés celular y apoptosis. Pero si un aumento significativo en la tasa de re – expansión comparado con el control, más no en eclosión. La suplementación con CLA disminuyó el contenido de lípidos neutros al afectar la síntesis de triglicéridos mediante la reducción de la expresión génica de 1 – acilglicerol, 3 – fosfato o – aciltransferasa (AGPAT). Al ácido linoleico, sobre todo a sus isómeros, en particular el CLA, se le atribuye disminuir la deposición citoplasmática de lípidos, demostrando actividad antilipopogénica (Evans et al., 2002; Pereira et al, 2007 y 2008). Pereira et al., (2008) reportaron que los CLA en embriones bovinos *in vitro*, disminuyeron el diámetro de las gotas lipídicas mejorando la crioresistencia. Accorsi et al., (2016) estudiaron el efecto de la adición de AL a un medio CIV semidefinido en concentración 100 µM con adición de BSA, reportando una reducción en la tasa de desarrollo embrionario con respecto al control ($p < 0.05$); pero influyendo positivamente en el descenso del contenido lipídico intracelular, aumentando consecuentemente la supervivencia embrionaria luego de 24 h post – congelación y no afectando el número total de células por embrión. El mejoramiento en la supervivencia embrionaria se pudo fundamentar en que los ácidos grasos actuarán modificando la composición de los lípidos de la membranas embrionarias, influyendo en su fluidez (Accorsi et al., 2016). El mecanismo por el cual el CLA afecta la acumulación de lípidos en el embrión es por una reducción en la incorporación y/o ensamblaje de los triglicéridos antes que por inhibición de la síntesis de novo (Pereira, et al., 2014), esto también podría ser aplicativo para el AL.

En estudios en humanos se han empleado ácidos grasos C¹³, en horas posteriores al cultivo, cuando el embrión se encuentra en 8 células; ya que embriones en estadio de 4 células poseen mayores concentraciones de ácidos grasos insaturados y han concluido que

el Ácido Linoleico es más importante en los estadios finales de desenvolvimiento (Haggarty et. al., 2006). El Ácido Linoleico estimula la proteína Kinasa C, que es crítica en el crecimiento y diferenciación celular (Haggarty et al., 2006, Accorsi et al., 2016).

Actualmente se estudia la influencia tanto del ácido linoleico como del linolénico en el desarrollo embrionario. Yang and Zheng (2012), estudiaron el efecto de la suplementación con Ácido Linolénico en el desarrollo temprano de embriones *in vitro* en búfalos, los presuntos cigotos fueron transferidos a medio CIV (TCM 199 + 10% SFB) suplementado con 0, 10, 50, 100 y 200 μM de ácido linolénico. Los resultados mostraron que las tasas de clivaje no difirieron significativamente entre grupos, aunque si hubo un aumento numérico en las concentraciones de 50 y 100 μM con respecto al control. El tratamiento 50 μM resultó en un porcentaje significativamente más alto en la tasa de desarrollo de blastocitos comparado con el grupo control y los otros tratamientos, siendo esta concentración la mejor para el desarrollo embrionario en búfalos. Este resultado fue similar al encontrado en este trabajo, pero con ácido linoleico y en especie bovina. Se ha reportado que los ácidos grasos poli-insaturados son potentes inhibidores de la glucólisis y lipogénesis de novo, a través de la regulación de la glucosa – 6 – fosfato deshidrogenasa (G6PDH), L – Piruvato quinasa (PK – L), ácido graso sintetasa (FAS) y acetil – CoA carboxilasa (ACC) (Dentin et al., 2005).

En el experimento 6, se observó que la adición de Fosfatidilcolina de soja al medio CIV en Día 3 o Día 5, no afectó el desarrollo embrionario, el número de células por embrión y la supervivencia a la congelación. Pugh et al., (1998) evaluaron el efecto de suplementar el medio de CIV con liposomas que contenían lecitina, esfingomielinea y colesterol. La esfingomielinea y el colesterol en razón 1:1, 1:4 y 4:1 fueron adicionados a 50, 100 y 150 microgramos/ml de lecitina, los blastocitos fueron congelados en 1.5 M de etilenglicol. Reportó que la presencia de liposomas en el medio de CIV no afectó el clivaje, el desarrollo embrionario y la supervivencia de blastocitos después de la congelación. Sin embargo la presencia de lecitina sola en concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ afectó negativamente la supervivencia del blastocito en el medio de congelación,

probablemente por la alteración de la composición de la membrana embrionaria. En el caso de este experimento se puede hipotetizar que los días propuestos no son los indicados para la adición de Fosfatidilcolina de soja y las concentraciones empleadas no son suficientes o adecuadas para sustituir algunos fosfolípidos de membrana y/o no entran a la membrana embrionaria para alterar la concentración de los lípidos neutros y así formar una película protectora alrededor de las células embrionarias, evitando así la formación de hielo intracelular y proteger aún más que el control de daños mecánicos. En este caso ejerciendo función de estabilizador de membrana.

Guyader et al., (1999), evaluaron el efecto de la lecitina de soja en una solución de glicerol para congelación lenta de embriones producidos *in vitro*. La congelación se realizó en dos etapas con glicerol al 5% y al 10% con 0.2 M de sacarosa, la lecitina se añadió al 0.1% p/v, observando que no ejerció efecto alguno en la re-expansión pero sí influyó significativamente en la eclosión a las 72 hs. En este caso la Lecitina de soja ejerció función de crioprotector no penetrante, mientras que en este trabajo de tesis no tuvo influencia alguna en la supervivencia post-congelación.

En el último experimento (Experimento 7) se evaluó la adición al medio de CIV en Día 5 de 100 μM de Cisteamina, 50 μM de ácido linoleico y 100 μM de Fosfatidilcolina de Soja. De acuerdo a los resultados obtenidos durante el desarrollo del experimento 4, se puede afirmar que la adición de 100 μM de Cisteamina en Día 5 del CIV, favoreció el desarrollo embrionario y la eclosión a las 72 hs de los embriones descongelados. Según los resultados del Experimento 5, la suplementación del medio CIV en Día 5 con 50 μM de Ácido Linoleico aumentó el porcentaje de embriones re-expandidos a las 24 hs y eclosionados a las 72 hs. Mientras que en el Experimento 6, la adición de Fosfatidilcolina de Soja no afectó la calidad embrionaria con respecto al control, en lo referente al número de blastómeras. Aunque no hubo diferencia significativa, su adición en Día 5 y en concentración de 100 μM fue la que presentó un leve aumento en el número de células por embrión y se plantea que hay una correlación entre la calidad y la viabilidad embrionaria con el número de células (Ushijima et al., 2008), por este motivo se

seleccionó esta concentración y este día, para evaluar su sinergia junto con la Cisteamina y el Ácido Linoleico.

Se observó que la adición de estos tres aditivos, no influyó sobre el desarrollo embrionario, el número de células por embrión y la supervivencia a la congelación; probablemente porque los ácidos grasos insaturados empleados no tuvieron efecto sobre la estabilización de la membrana embrionaria, al no incorporarse a ella durante el CIV y no inducir cambios en su fluidez. También se podría plantear que la adición de Fosfatidilcolina no ejerció un efecto positivo junto con la Cisteamina y el ácido linoleico, siendo probable que sólo la combinación de Cisteamina y ácido linoleico en la concentración y día propuesto, podría ser favorable para la supervivencia a la congelación. Esto basado también en los resultados de Pugh et al. (1998), quienes reportaron que la adición de lecitina de soja a una preparación de liposomas no afectó el desarrollo embrionario, pero si la supervivencia embrionaria, probablemente mediante la alteración de la membrana plasmática.

Por lo anterior la hipótesis dos del presente trabajo no se cumplió, un medio de cultivo secuencial suplementado con Cisteamina, Acido Linoleico y Fosfatidilcolina de Soja, no aumentó la supervivencia de los embriones congelados producidos *in vitro*. Sería interesante evaluar el comportamiento de la adición de Cisteamina y Acido linoleico en el Día 5 de CIV, en las concentraciones propuestas.

CONCLUSIONES

Los resultados de esta tesis no confirman las hipótesis propuestas. La adición de 100 μM de Cisteamina y 100 ng/ml de EGF en el medio MIV, no aumentó la supervivencia de embriones congelados producidos *in vitro*. La adición de 50 μM de Ácido Linoleico, 100 μM de Cisteamina y 100 μM de Fosfatidilcolina de Soja en el Día 5 de CIV, no aumentó la supervivencia de los embriones congelados producidos In Vitro.

Las conclusiones específicas de esta tesis son:

- La adición de 50 ng/ml y de 100 ng/ml de EGF al medio MIV, favoreció la maduración nuclear de los ovocitos, pero no ejerció influencia sobre el desarrollo embrionario y la supervivencia de embriones congelados.
- La adición de 100 μM de Cisteamina al medio MIV favoreció la maduración nuclear de los ovocitos y presentó una tendencia al aumento de embriones re – expandidos descongelados.
- La adición de 100 μM de Cisteamina y 100 ng/ml de EGF, influyó sobre el desarrollo embrionario, ya que produjo un aumento en el porcentaje de clivaje y en el porcentaje de embriones, pero no influyó en la supervivencia embrionaria posterior a la descongelación.
- La adición de 50 o 100 μM de Cisteamina en el Día 3 de CIV, afectó el desarrollo embrionario, debido a que se presentó una disminución en el porcentaje de embriones.
- La adición de 100 μM de Cisteamina en el Día 5 de CIV favoreció la producción de embriones (aumentó el porcentaje de embriones), y la eclosión a las 72 hs. de embriones criopreservados mediante congelación lenta con EG.
- Suplementar con 50 μM de Acido Linoleico en el Día 3 de CIV, favoreció el clivaje y presentó una tendencia al aumento en el porcentaje de embriones, mientras que con 100 μM de Acido Linoleico se presentó una tendencia a

aumentar la división celular y favoreció la producción de embriones. La adición de 50 o 100 μM en d Día 3 o Día 5 de CIV favoreció la eclosión de embriones descongelados.

- La suplementación de Fosfatidilcolina de Soja en el medio de CIV no ejerció efecto sobre el desarrollo embrionario, supervivencia a la criopreservación mediante congelación lenta con EG y el número de blastómeras.

BIBLIOGRAFIA

- Abe, H., Otoi, T., Tachikawa, S., Yamashita S., Satoh T., and Hoshi H. 1999 a. Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro. *Anat. Embryol. (Berl.)*. 199(6): 519 – 527.
- Abe, H., Yamashita, S., Itoh, T., Satoh T., and Hoshi H. 1999 b. Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro matured and fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum free médium or in serum supplemented medium. *Mol. Reprod. Dev.* 53(3): 325 – 335.
- Abe, H., and Hochi, H. 2003. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free. *J. Reprod. Dev.* 49: 193 – 202.
- Abe, H., Shiku, H., Aoyagi, S., and Hoshi, H. 2004. In Vitro culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos. *J. Mamm. Ova. Res.* 21: 22 – 30.
- Abeydeera, L.R., Wang, W.H., Cantley, T.C., Rieke, A., Prather, R.S., and Day, B.N. 1998. Presence of epidermal growth factor during In Vitro maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after in vitro fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 51(4): 395 – 401.
- Abeydeera, L.R., Wang, W.H., Cantley, T.C., Rieke A., Murphy, C.N., Prather, R.S., and Day, B.N. 2000. Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology*. 54: 787 – 797.
- Accorsi, M.F., Leão, B.C., Rocha-Frigoni, N.A., Perri, S.H., and Mingoti, G.Z. 2016. Reduction in cytoplasmic lipid content in bovine embryos cultured in vitro with linoleic acid in semi – defined medium is correlated with increase in cryotolerance. *Zygote*. 24(4): 485-494.

- Adamiak, S.J., Powell, K., Rooke, J.A., Webb, R., and Sinclair, K.D. 2006. Body condition, dietary carbohydrates and fatty acids determine post – fertilisation development of bovine oocytes In Vitro. *Reproduction*. 131(2): 247 – 258.
- Aflalo, E.D., Sod-Moriah, U.A., Potashnik, G., and Har-Vardi, I. 2005. Expression of plasminogen activators in preimplantation rat embryos developed in vivo and in vitro. *Reproductive, Biology and Endocrinology*. 3:7. Disponible en: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-3-7>.
- Aflalo, E.D., Sod- Moriah, U.A., Potashnik, G., and Har-Vardi, I. 2007. EGF increases expression and activity of Pas in preimplantation rat embryos and their implantation rate. *Reproductive, Biology and Endocrinology*. BioMed Central. 5(4): 1 – 11. Disponible en: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-5-4>.
- Agarwal, A., Gupta, S., and Sharma, RK. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive, Biology and Endocrinology*. Review. 3: 28.
- Agca Y., Liu, J., Peter, A.T., Crister, E.S., and Crister, J.K. 1998. Effect of developmental stage on bovine oocyte plasma membrane wáter and cryoprotectant permeability characteristics. *Mol. Reprod. Dev.* 49(4): 408 – 415.
- Agnez –Lima, L.F., Melo, J.T.A., Silva, A.E., Oliveira, A.H., Timoteo, A.R., Lima-Bessa, K.M., Martinez, G.R., Medeiros, M.H.; Di Mascio, P., Gahlardo, R.S., and Menck, C.F. 2012. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. *Mutation Research – Rewiews in Mut. Res.* 751 (1): 15 – 28.
- Aires, VA., Hinsch, KD., Mueller-Schloesser, F., Bogner, K., Mueller-Schloesser, S., and Hinsch, E. 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk – based and soybean lecithin – based extenders for cryopreservation of bovine. *Theriogenology*. 60(2): 269 – 279.
- Akhter, S., Ansari, M.S., Andrabi, S.M., Rakha, B.A., Ullah, N., and Khalid, M. 2012. Soya – lecithin in extender improves the freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 47(5): 815 – 819.

- Ali, A.A., Bilodeau, J.F., and Sirard, M.A. 2003. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology*. 59(3-4): 939 – 949.
- Alvarez, J.G., and Storey B.T. 1993. Evidence for increased lipid peroxidative damage and los sor superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J. Androl*. 14: 232 – 241.
- Assumpcao M.E.O.A., Milazzotto, M.P., Simoes, R., Nicacio, A.C., Mendes, C.M.; Bell, M.R.B., and Visintin, J.A. 2008. In Vitro survival of in vitro – produced bovine embryos cryopreserved by slow freezing, fast freezing and vitrification. *Anim. Reprod*. 5(3/4): 116 – 120.
- Ávila –Portillo, L.M., Madero, J., López, C., León, M.F., Acosta, L., Gómez C., Delgado, L.G., Gómez, C., Lozano, J.M., and Reguero, M.T. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 57 (4): 291 – 300.
- Aykurt, M., Zaki, G., and Habeebullah, B. 2002. Freezing phenomena in ice water systems. *Energy Conversion and Management*. 43(14): 1773 – 1789.
- Bailey, C.L., Sarmiento-Guzmán, J.A., Farmer, S.E., Gentry, G.T., Lynn, J.W., Bondioli, K.R., and Godke, R.A. 2015. Effects of dietary conjugated linoleic acid supplementation on bovine oocyte lipid metabolism, lipid composition, and embryo cryotolerance. *Reprod. Fert. Dev.* 27 (1): 117 – 18. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1071/RDv27n1Ab49>.
- Bain, N.T., Madan, P., and Betts D.H. 2011. The early embryo response to intracelular reactive oxygen species is developmentally regulated. *Reprod. Fert. Dev.* 23 (4): 561 – 575.
- Ballard, C.B., Looney, C.R., Lindsay, B.R., Pryor, J.H., Lynn, J.W., Bondioli, K.R., and Godke, R.A. 2007. Comparing oocyte lipid content with circulating cholesterol and triglyceride levels of Bos Taururs and Bos Indicus donor cows. *Reprod. Fert. Dev.* 20(1): 177. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1071/RDv20n1Ab196>.

- Bavister, B.D., Rose-Hellekant, T.A., and Pinyopummintr, T. 1992. Development of in vitro matured / in vitro fertilized bovine embryos into morula and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*. 37(1): 127 – 146.
- Block, J., Fischer – Brown, A.E., Rodina, T.M., Ealy, AD., and Hansen, P.J. 2007. The effect of In Vitro treatment of bovine embryos with IGF – I on subsequent development in utero to day 14 of gestation. *Theriogenology*. 68(2): 153 -161.
- Block, J., Zolini, A.M., Carrascal-Triana, E., Ruiz, A., Hansen, P.J., and Torres, C.A.A. 2015. Effects of L – Carnitine and trans – 10, cis – 12 conjugated linoleic acid supplementation during maturation on development and cryotolerance of bovine embryos produced In Vitro. *Reprod. Fert. Dev.* 28 (2): 147. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1071/RDv28n2Ab34>.
- Boiso, I. Principios Básicos de Criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. Ponencia. 1º Congreso ASEBIR – Murcia en Madrid, España, 2001. En: *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 18 (4): Julio – Agosto, 2001.
- Boni, R., Tosti, E., Roviello S., Dale B. 1999. Intracellular communication In Vivo and In Vitro produced bovine embryos. *Biol. Reprod.* 61: 1050 – 1055.
- Bousseau, S., Brillard, J.P., Marguant-Le, G.B., Guérin, B., Camus, A., and Lechat, M. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*. 50(5): 699 – 705.
- Caamaño, J.N., Ryoo, Z.Y., Thomas, J.A., and Youngs, C.R. 1996. β - mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine in vitro – matured/in vitro fertilized embryos. *Biol. Reprod.* 55(5): 1179 – 1184.
- Camous, S., Heyman, Y., Méziou, W., Ménézo, Y. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fertil.* 72(2): 479 – 485.
- Cárdenas-Rodríguez, N. y Chaverri, J.P. 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química – Biomédica*. 17 (2): 164 – 173.

- Castillo, C., Benedito, J.L., López-Alonso, M., Miranda, M., and Hernandez, J. 2001. Importance of oxidative stress in cattle: its relationship with the physiological condition (pregnancy and parturition) and nutrition. *Arch. Med. Vet.* 33 (1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/s50301-732x200100100001>.
- Castillo – Martín, M., Bonet, S., Morató, R., and Yeste, M. 2014. Comparative effects of adding β -mercaptoethanol or L-ascorbic acid to culture or vitrification – warming media on IVF porcine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 26 (6): 875 – 882.
- Catalá, A. 2011. Lipid peroxidation. *Principles of Free Radical Biomedicine*. Vol. 1. Ed. K. Pantopoulos, HM. Schipper. Nova Science Publisher, Inc.
- Chaubal, S.A., Molina, J.A., Ohlrichs, C.L., Ferre, L.B., Faber, D.C., Bols, P.E.J., Riesen, J.W., Tian, X., and Yang, X. 2006. Comparison of different transvaginal ovum pick – up protocols to optimize oocyte retrieval and embryo production over a 10 – week period in cows. *Theriogenology*. 65(8): 1631-1648.
- Citit, U., and Bagis, H. 2013. Comparison of cryoprotective effects of iodixional, threulose and cysteamine on ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 139: 38 – 44.
- Corcoran, D., Fair, T., Park S., Rizos D., Patel O.V., Smith G.W., Coussens, P.M., Ireland, J.J., Boland, M.P., Evans, A.C.O., and Lonergan, P. 2006. Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in In Vitro compared with In Vivo cultured bovine embryos. *Reproduction*. 131: 651 – 660.
- Cornejo, R. 2011. Epidermal Growth Factor and mammary epithelial differentiation. *Int. J. Morphol.* 29 (3): 821 – 824.
- Deleuze, S., and Goudet, G. 2010. Cysteamine supplementation of In Vitro maturation media. *Reprod. Domest. Anim.* 45 (6). 476 – 482.
- De Matos, D.G., Furnus, C., Moses, D.F., and Baldsarre, H. 1995. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 42(4): 432 – 436.

- De Matos, D., Furnus, C., Moses, D.F., Martinez, A.G., and Matkovic, M. 1996. Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured and its effect on embryo development and freezability. *Mol. Reprod. Dev.* 45(4): 451 – 457.
- De Matos, D.G., and Furnus, C. 2000. The important of having high glutathione level alter bovine in vitro maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cysteine. *Theriogenology*. 53(3): 761 – 770.
- De Matos, D.G., Gasparini, B., Pasqualini, S.R, and Thompson, J.G. 2002 a. Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology*. 57(5): 1443 – 1451.
- De Matos, D., Herrera, C., Cortvrindt, R., Smitz, J., Van Soom, A., Nogueira, D., and Pasqualini, R.S. 2002 b. Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine in vitro embryo production. *Mol. Reprod. Dev.* 62(2): 203 - 209.
- Dentin, R., Benhamed, F., Pégory, J.P., Fougelle, F., Viollet, B., Vaulont, S., Girard, J., and Postic, C. 2005. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J. Clin. Invest.* 115 (10): 2843 – 2854.
- De Sousa, P.A., Watson, A.J., and Schultz, R.M. 1998. Transient expression of a translation initiation factor is conservatively associated with embryonic gene activation in murine and bovine embryos. *Biol. Reprod.* 59(4): 969 – 977.
- Dhali, A., Anchamparathy, V.M., Butler, S.P., Mullarky, I.K., Pearson, R.E., and Gwazdauskas, F.C. 2011. Developmental and quality of bovine embryos produced In Vitro using growth factor supplemented serum free system. *Open J. Anim. Sci.* 1(3): 97 – 105.
- Dickinson, D.A., and Forman, H.J. 2002. Cellular Glutathione and thiols metabolism. *Biochemical pharmacology*. 64:1019 – 1026.

- Dinnyes, A., Carolan C., Lonergan, P., Solti, P., Massip, A., and Mermillod, P. 1995. In Vitro survival of IVF bovine embryos frozen or vitrified by techniques suitable for direct transfer. *Theriogenology*. 43: 197.
- Dinnyes, A., Liu, J., and Nedambale, T.L. 2007. Novel gamete storage. *Reprod. Fert. Dev.* 19: 719 – 731.
- Dobrinsky, J. 2002. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*. 57: 285 – 602.
- Downs, S.M. 1989. Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus in vitro. *Biol. Reprod.* 41: 371 – 379.
- Jahanian, E., Nanaei, A.H., and Kor, N.M. 2013. The dietary fatty acids and their effects on reproductive performance of ruminants. *Euro. J. Exp. Bio.* 3 (6): 95-97.
- Evans, M., Lin, X., Odle, J., and McIntosh, M. 2002. Trans – 10, cis – 12 conjugated linoleic acid increases fatty acid oxidation in 3t3 – L1 preadipocytes. *J. Nutr.* 132 (3): 450 – 455.
- Eyestone, W.H. and First, N. 1989. Co-culture of early cattle embryo to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.* 85: 715 – 720.
- Fair, T., Lonergan, P., Dinnyes, A., and Boland, M. 2001. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of blastocyst production. *Mol. Reprod. Dev.* 58(2): 186 -195.
- Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S.M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L., Abedi, P., Nili, N., Rahmani, H.R., and Nars-Esfahani, M.H. 2010. In vitro comparison of egg yolk – based and soybean lecithin – based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. 73(4): 480 – 487.
- Fukuda, Y., Ichiwaka, M., Naito, K., and Toyoda, Y. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.* 42(1): 114 – 119.

- Fukui, Y., Glew, A.M., Gandolfi, F., and Moor, R.M. 1988. Ram – specific effects on in vitro fertilization and cleavage of sheep oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Fert.* 82(1): 337 – 340.
- Fukui, Y.; McGown, L.T.; Pugh, P.A., and Tervit, HR. 1991. Factors affecting the in vitro development to blastocyst of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 92(1): 125 – 131.
- Galli, C., Crotti, G., Notari, C., Turini, P., Duchi, R., and Lazzari, G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology.* 55(6): 1341 – 1357.
- Goldman, S., Dirnfeld, M., Koifman, M., Gonen, Y., Lissak, A., and Abramovici, H. 1993. The effect of epidermal growth factor and differentiation of mouse preimplantation embryos In Vitro. *Hum. Reprod.* 8(9): 1459-1462.
- Gordon, I. 2003. *Laboratory Production of cattle Embryos*, 2nd edition. *Biotechnology in Agriculture Series. No.27.* CABI Publishing. pp.: 258 – 260.
- Grazul – Bilaska, AT.; Choi, JT.; Bilski JJ.; Weigl RM.; Kirsch, JD.; Reynolds LP.; and Redmer DA. 2003. Effects of Epidermal Growth Factor on early embryonic development after In Vitro fertilization of oocytes collected ewes treated with follicle stimulating hormone. *Theriogenology.* 59: 1449 – 1457.
- Greve, T.; Madison, V.; Avery, B; Callesen, H.; and Hyttel, P. 1993. In vitro production of bovine embryos. A progress report and the consequences on the genetic upgrading of cattle populations. *Anim. Reprod. Sci.*, 33(1/4): 51 – 69.
- Guerin, P., El Mouatassim, S., and Menezo Y. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre – implantation embryo and its surroundings. *Human Reprod. Update.* 7 (2): 175 – 189.
- Guler, A.; Paulin, P., Mermillod P., Terqui M., and Cognie Y. 2000. Effect of growth factors, EGF and IGF – I and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. *Theriogenology.* 54(2): 209 – 218.

- Guo, L.; Tang, B.; Ma, X.; Gao, F.; Zhnag, JB.; and Li, ZY. 2009. Effects of 17 - β - estradiol and cisteamine on in vitro maturation of beef cattle oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.* 22(1): 326. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1071/RDv22n1Ab339>.
- Gutierrez, J. 2006. ¿Qué sabe usted acerca de radicales libres?. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 37 (4): 69 – 73.
- Gutteridge, JM. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 41: 1819 – 1828.
- Guyader – Joly, C.; Menezo, Y.; Ponchon, S.; Durand, M.; Heyman, Y.; and Renard, JP. 1999. Effect of lecithin on in vitro and in vivo survival of in vitro produced bovine blastocysts after cryopreservation. *Theriogenology.* 52(7): 1193 – 1202.
- Haggarty, P.; Wood, M.; Ferguson, E.; Hoad, G.; Srikantharajah, A.; Milne, E.; Hamilton, M.; and Brattacharya, S. 2006. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. *Hum. Reprod.* 21 (3): 766 – 773.
- Hanada, S.; Harada, M.; Kumemura, H.; Bishr Omary, M.; Koga, H.; Kawaguchi, T.; Taniguchi, E.; Yoshida, T.; Hisamoto, T.; Yanagimoto, C.; Maeyama, M.; Ueno, T.; and Sata M. 2007. Oxidative stress induces the endoplasmic reticulum stress and facilities inclusion formation in cultured cells. *J. Hepatol.* 47(1): 93 – 102.
- Harper, K. and Brackett, G. 1993. Bovine Blastocyst Development after In Vitro maturation in a defined medium with Epidermla Growth Factor and low concentration of Gonadotropins. *Biol. Reprod.* 48: 409 – 416.
- Harris, RC.; Chung, E.; and Coffey, RJ. 2003. EGF receptor ligands. *Exp. Cell. Res.* 284 (1): 2 – 13.
- Hasler, JF.; Henderson, WB.; Hurtgen, PJ.; Jin, ZQ.; McCauly, AD.; Mower, SA.; Neely, B.; Shuey, LS.; Stokes, JE.; and Trimmer, SA. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology.* 43(1): 141 – 152.

- Hasler, JF. 1998. The current status of oocyte recovery In Vitro embryo production and embryo transfer in domestic animals with an emphasis on the bovine. *J. Anim. Sci.* 76(3): 52 – 74.
- Hasler, JF. 2002. The freezing, thawing and transfer of cattle embryos. En: Field, M.J.; Sand, R.S., and Yelich, J.V. Factors affecting calf crop. *Biotechnology of Reproduction*. Ed. CRC Press. Boca Ratón, USA. pp.: 119 – 129.
- Hasler, JF. 2010. Synthetic media for culture, freezing and vitrification of bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 22(1): 119 – 125.
- Havlicek, V.; Lopatarova, M.; Cechi, S.; Dolezel, R.; Huber, T.; Pavlok, A.; Brem, G.; and Besenfelder, U. 2005. In vivo culture of bovine embryos and quality assessment of In Vivo vs. In Vitro produced embryos. *Vet. Med. - Czech.* 50 (4): 149 - 157.
- Heldin, CH., and Westermark, B. 1989. Growth Factors as transforming proteins. *Eur. J. Biochem.* 184: 487 – 496.
- Hernandez – Fonseca, HJ.; Palomares – Naveda, R.; Soto Belloso, E.; and Brackett, B.G. 2004. Effect of Epidermal Growth Factor (EGF) during oocyte maturation on In Vitro production of Bovine embryos. *Reprod. Fert. Dev.* 16 (2): 257. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1071/RDv16n1Ab373>.
- Herrler, A.; Kruschec, C.; and Beier, H. 1998. Insulin and insulin like growth factor – I promote rabbit blastocysts development and prevent apoptosis. *Biol. Reprod.* 59: 1302 – 1310.
- Heyman, Y., and Ménézo, Y., 1987. Interaction of trophoblastic vesicles with bovine embryos developing in vitro. *The Mammalian Preimplantation embryo*. Bavister BD Ed., Plenum Press, New York. pp.: 175 – 191.
- Holm, P., and Callesen, H. 1998. In vivo versus In vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod. Nutr. Dev.* 38: 579 – 594.

- Holm, P., and Callesen, H. 2002. Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo and in vitro derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum containing media. *Reproduction*. 123: 553 – 565.
- Hoschi, S.; Kozawa, M.; Fujimoto, T.; Hondo, E.; Yamada, J.; and Oquri, N. 1996. In Vitro maturation and transmission electron microscopic observation oocytes after vitrification. *Cryobiology*. 33(3): 300 – 310.
- Ikeda, K.; Takashi, Y.; and Katagiri, S. 2000. Effect of medium change on the development of in vitro matured and fertilized bovine oocytes cultured in medium containing aminoacids. *J. Veterinary Medical Science*. 62(1): 121 – 123.
- Imai, K.; Kobayashi, S.; Goto, Y.; Dochi, O.; and Shimoira, I. 1997. Cryopreservation of bovine embryos obtained by in vitro culture of IVM – IVF oocytes in the presence of linoleic acid – albumin. *Theriogenology*, 47(1): 347. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)82474-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(97)82474-0)
- Iwasaki, S.; Yoshiba, N.; Ushijima, H.; Watanabe, S.; and Nakahara, T. 1990. Morphology and proportion of the inner cell mass of bovine blastocysts fertilized In Vitro and In Vivo. *J. Reprod. Fertil*. 90: 279 – 284.
- Iwata, H.; Akamatsu, S.; Minami, N.; and Yamada, M. 1998. Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. *Theriogenology*. 50(3): 365 – 375.
- Kajihara, Y.; Blakewood, E.G.; Myers, M.W.; Kometani, N.; Goto, K.; and Godke, R.A. 1991. In vitro maturation and fertilization of follicular oocytes obtained from calves (Abstract). *Theriogenology*. 35(1): 220.
- Kane, MT.; Morgan PM.; and Coonan, C. 1997. Peptide growth factors and preimplantation development. *Hum. Reprod. Update*. 3: 137 – 157.
- Khurana, NK., and Niemann, H. 2000. Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocyst derived “in vitro” or “in vivo”. *Theriogenology*, 54: 313 – 326.

- Kobayashi, K.; Tagaki, Y.; Satoh, T.; and Oikawa, T. 1992. Development of early bovine embryos to the blastocyst stage in serum - free conditioned medium from bovine granulose cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28A (4): 255 – 259.
- Kobayashi, K.; Yamashita, S.; and Hoshi, H. 1994. Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor – alpha on in vitro maturation of cumulus cell – enclosed bovine oocytes in a defined medium. *J. Reprod. Ferti.* 100: 439 – 446.
- Kosower, N.S., and Kosower, E.M. 1983. Glutathione and cell membrane thiol status functions of glutathione. *Larson. A. Nueva York Editorial. Raven.* pp.: 307 – 315.
- Laowtammathron, C.; Lorthongpanich, C.; Ketudat-Cairns, M.; Hoschi, S.; and Parnpai, R. 2005. Factors affecting cryosurvival of nuclear – transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid – albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. *Theriogenology.* 64(5): 1185 – 1196.
- Larocca, C.; Fila, S.; Kmaid, S.; Fernández, A.; Lago, I.; and Roses, G. 1998. Viabilidad de embriones bovinos producidos In Vitro congelados – descongelados en dos medios de cultivo con β – mercaptoetanol. *Arch. Zootec.* 47: 3 – 10.
- Leao, B.C.S.; Frigoni, N.A.S.R.; Dall'Acqua, PC.; Ambrogi, M.; and Mingoti, GZ. 2015. Supplementation with linolenic acid, L – Carnitine, alone or associated, during IVM resulted in decrease of ROS levels and apoptotic index of Bovine in vitro produced embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 28(2): 232 – 233. [dx.doi.org/10.1071/RDv28n2Ab203](https://doi.org/10.1071/RDv28n2Ab203).
- Lee, ES., and Fukui, Y. 1995. Effect of various growth factors in a defined medium on in vitro development of bovine embryos matured and fertilized in vitro. *Theriogenology.* 44: 71 – 83.
- Leibo, S.P.. and Loskutoff N.M. 1993. Cryobiology of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology,* 39: 81 – 94.
- Leibo, SP., and Songsasen, N. 2002. Cryopreservation of gametes and embryos of nondomestic species. *Theriogenology.* 57: 303 - 326.

- Li, J., Foote, R.H., and Simkin, M. 1993. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine or superoxide dismutase. *Biol. Reprod.* 48(1): 33 – 37.
- Lonergan, P., Carolan, C., Van Langendonck, A., Donnay, I., Kathir, H., and Mermillod, P. 1996. Role of Epidermal Growth Factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol. Reprod.* 54(6): 1420 – 1429.
- Lonergan, P., and Fair, T. 2008. In Vitro produced bovine embryos dealing with the warts. *Theriogenology.* 69: 17 – 22.
- Looney, CR., and Pryor JH. 2009. Practical applications of new research information in the practice of bovine embryo transfer. *Reprod. Fert. Dev.* 22 (5305): 145 – 150.
- Lu, K. H., Gordon, I., Gallagher, M., and McGovern, H. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *Vet. Rec.* 121(11): 259 – 260.
- Luciano, A.M., Modina, S., Vassena, R., Milanesi, E., and Gandolfi, F. 2004. Role of intracellular cyclic adenosine 3' - 5' - monophosphate concentration and oocyte – cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during In Vitro maturation of bovine oocyte. *Biol. Reprod.* 70(2): 465 – 472.
- Ludwing, M., Al-Hassani, S., Felberbaum, R., and Diedrich K. 1999. New aspects of cryopreservation of oocytes and embryos in assisted reproduction and future perspectives. *Hum. Reprod.* 14(1): 162 – 185.
- Mapletoft, R.J. 2013. History and perspectives on bovine embryo transfer. *Anim. Reprod.* 10 (3): 168 – 173.
- Marei, W.F., Wathes, C., and Fouladi – Nasha, A. 2009. The effect of linolenic acid on bovine oocyte maturation and development. *Biol. Reprod.* 81: 1064 – 1072.
- Marei, W.F., Wathes, C., and Fouladi – Nasha, A. 2010. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. *Reproduction.* 139: 979 – 988.

- Martín – Romero, F.J.; Miguel – Lasobras, E.M.; Dominguez-Arroyo, J.A.; González-Carrera, E.; and Alvarez, I.S. 2008. Contribution of the culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. *Reprod. Biomed. Online*. 17(5): 652 – 661.
- Martínez, M.; Barrado, D.A.; Zubillaga, M.; Hager, A.; De Paoli, T.; and Boccio, I. 2006. Conceptos actuales del metabolismo del glutathion. Utilización de isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam*. 40 (1): 45 -54.
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol*. 247: C125 – 142.
- Mc Evoy, TG.; Coull, GD.; Broadbent, PJ.; Hutchinson, JS.; and Speake, BK. 2000. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J. Reprod. Fertil*. 118(1): 163 – 170.
- Meirelles, FV.; Caetano, AR.; Watanabe, YF.; Ripamonte, P.; Carambula, SF.; Merighe, GK.; and García, SM. 2004. Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci*. 82-83: 13 – 20.
- Meister, A., and Tate, SS. 1976. Glutathione and related gamma – glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Annual Review of Biochemistry*. 45: 559 – 604.
- Meister, A.; Tate, SS.; and Grau, EM. 1979. Conversion of glutathione to glutathione disulfide by cell membrane-bound oxidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76 (6): 2715 – 2719.
- Memili, E., and First, NL. 2000. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared other species. *Zygote*. 8: 87 – 96.
- Menezo, YJ. 2004 a. Cryopreservation of IVF embryos: Wich stage?. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol*. 113 (1): 528 – 532.
- Menezo, YJ. 2004 b. Blatocyst Freezing. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol*. 115 (1): 512 – 515.

- Meryman, H.T. 1971. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. *Cryobiology*. 8: 489-500.
- Mermillod, P., Vansteenbrugoe, A., Wils, C., Mourmeaux, J.L., Massip, A., and Dessy, F. 1993. Characterization of the embryo trophic activity of exogenous protein – free oviduct – conditioned medium used in culture of cattle embryos. *Biol. Reprod.* 49: 582 – 587.
- Merton, J.S., Landman, B., and Mullaart, E. 2005. Effect of cysteamine during In Vitro maturation of OPU derived Bovine oocytes on further In Vitro embryonic development and pregnancy rate. *Reprod. Fertil. Dev.* 18(2): 251. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1071/RDv18n2Ab287>.
- Merton, J.S., Knijn, H.M., Flapper, H., Dotinga, F., Roelen, B.A., Vos, P.L., and Mullaart, E. 2013. Cysteamine supplementation during in vitro maturation of slaughterhouse and OPU – derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate and calf characteristics. *Theriogenology*. 80 (4): 365 – 371.
- Mucci, N., Aller, J., Cabodevila, J., Kaiser, G., Hozbor, F., and Albeiro, R.H. 2005. Criopreservación de embriones bovinos. *Taurus, Bs. As.*; 7 (26): 20 – 35.
- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G.G., Hozbor, F., Cabodevila, J., and Albeiro, R.H. 2006. Effects of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*. 65 (8): 1551 – 1562.
- Mtango, N.R., Varisanga, M.D., Dong, Y.J., Rajamahendran, R., and Suzuki, T. 2003. Growth factors and growth hormone enhance In Vitro embryo production and post – thaw survival of vitrified bovine blastocyst. *Theriogenology*. 59 (5 – 6): 1393 – 1402.
- Mullen, S.F.; Agca, Y., Broermann, D.C., Jenkins, C.L., Johnson, C.A., and Critser, J.K. 2004. The effect of osmotic stress on the metaphase II spindle of human oocytes and the relevance to cryopreservation. *Hum. Reprod.* 19 (5): 1148 – 1154.
- Murphy, M.P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical J.* 417 (1): 1 – 13.

- Nagai, T. The improvement of in vitro maturation system for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*. 55(6): 1291- 1301.
- Nömm, M., Mark, E., Sarv, O., Köks, S., and Jaakma, Ü. 2015. Produced in serum – free in vitro production system. *Reprod. Fert. Dev.* 28(2): 227 – 228. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1071/RDv28n2At193>.
- Oyamada, T., and Fukui, Y. 2004 a. Oxygen tension and medium supplements for In Vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *J. Reprod. Dev.* 50 (1): 107 -117.
- Oyamada, T., and Fukui, Y. 2004b. Additional effect of epidermal growth factor during In Vitro maturation for individual bovine oocytes using a chemically defined medium. *Zygote*. 12 (2): 143 – 150.
- Papa, F.O., Felicio, G.B., Melo-Oña, C.M., Alvarenga, M.A., De Vita, B., Trinque, C., Puoli-Filho, J.N., and Dell’acqua, J.A Jr. 2011. Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.* 129(1-2): 73 -77.
- Park, Y.S., and Lin, Y.C. 1993. Effect of epidermal growth factor (EGF) and defined simple media on in vitro bovine oocyte maturation and early embryonic development. *Theriogenology*. 39(2): 475 – 484.
- Parrish, J.J., Susko – Parrish J.L., Winer, M.A., and First, N.L 1988. Capacitation of bovine spermatozoa by heparin. *Biol. Reprod.* 38(5): 1171 – 1180.
- Pavao, G.A. 2009. Viabilidade da producao in vitro de embrioes ovinos em meio de maturation suplementado com soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA) acrescido ou não de Cisteamina. Dissertacao (mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, S.P. – Brasil. Disponible en: <http://hdl.handle.net/11449/98216>.
- Pereira, R.M., Baptista, M.C.; Vasques, M.I., Horta, A.E., Portugal, P.V., Bessa, R.J., Silva, J.C., Pereira, M.S., and Marques, C.C. 2007. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans – 10, cis -12 conjugated linoleic acid (10 t, 12 c CLA). *Anim. Reprod. Sci.* 98 (3-4): 292 – 301.

- Pereira, R.M., Carvahalais, I., Pimenta, J., Baptista, M.C., Vasques, M.I., Horta, A.E.M., Santos, I.C., Marques, M.R., Reis, A., Silva Pereira, M., and Marques, C.C. 2008. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by 10 t, 12 c CLA supplementation during in vitro embryo culture. *Anim. Reprod. Sci.* 106: 322 – 332.
- Pereira Batista, R.J., Barbosa Raposo, N.R., Almeida Campos Jr., P.H., Pereira, M.M., Almeida Camargo, L.S., Campos Carvalho, B., Sundfeld Gama, M.A., and Moreira Viana, J.H. 2014. Trans – 10, Cis -12 conjugated linoleic acid reduces neutral lipid content and may affect cryotolerance of In Vitro – produced crossbred bovine embryos, *J. Anim. Sci. Biotech.* 5(1): 33. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1186/2049-1891-5-33>.
- Perry, G. 2015. 2014 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. *Embryo Transfer Newsletter.* 33(4): 9- 18.
- Piccinato, C.A., Sartori, R., Sangsritavong, S., Souza, A.H., Grummer, R.R., Luchini, D., and Wiltbank, M.C. 2010. In vitro and in vivo analysis of fatty acid effects on metabolism of 17 β -estradiol and progesterone in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93 (5): 1934 – 1943.
- Pollard, J.W., and Leibo S.P. 1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology.* 41: 101 – 106.
- Pontes, J.H.F., Melo Sterza, F.A., Basso, A.C., Ferreira, C.R., Sanches, B.V., Rubin, K.C.P., and Seneda, M.M. 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.
- Pomar, F.J., Teerds, K.J., Kidson, A., Colenbrander, B., Tharasanit, T., Aguilar, B., and Roelen, B.A. 2005. Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology.* 63(8): 2254 – 2268.
- Prochazka, R., Srsen, V., Nagyová, E., Miyano, T., and Flechon, J.E. 2000. Developmental regulation of effect of epidermal growth factor on porcine oocyte-cumulus cell

complexes: nuclear maturation, expansion and F-actin remodeling. *Mol. Reprod. Dev.* 56(1): 63 – 73.

Pryor, J.H., Looney, C.R., Romo, S., Kraemer, D.C., and Long, C.R. 2008. The effect of lipid segregation with or without zona pelucida laser drilling on post – thaw embryo development of in vitro – produced bovine embryos. *Reprod. Fert. Dev.* 20 (1): 125 – 126.

Pugh, P.A., Ankersmit, A.E., McGowan, L.T., and Tervit, H.R. 1998. Cryopreservation of In Vitro – produced bovine embryos: Effects of protein type and concentration during freezing or of liposomes during culture on post – thaw. *Theriogenology.* 50 (3): 495 – 506.

Purohit, N.A., Brady, M.S., and Sharma, S.S. 2005. Influence of epidermal growth factor and insulin – like growth factor I on nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complexes in serum free media and their subsequent development in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 87(3/4): 229 – 239.

Qu, J., Godin, P.A., Nisolle, M., and Donnez, J. 2000. Distribution and epidermal growth factor receptor expression of primordial follicles in human ovarian tissues before and after cryopreservation. *Human Reproduction.* 15(2): 302 – 310.

Rausell, F., and Tarin, J.J. 2005. Función del glutatión reducido durante la maduración y fecundación de ovocitos y de sarrollo pre-implantatario de embriones in vitro en mamíferos. *Revista Iberoamericana de Fertilidad.* 22(6): 415 – 429.

Reed, M., Ezeh, P.C., Hamic A., Thompson, D.J., and Caperton, C.L. 2009. Soy lecithin replaces egg yolk for cryopreservation of human sperm without adversely affecting postthaw motility, morphology, sperm DNA integrity, or sperm binding to hyaluronate. *Fertility and sterility.* 92 (5): 1787 – 1790.

Reis, A., Mc Callum, G.J., Staine, M.E., Ewen, M., Lomax, M.A., Rooke, J.A., and McEvoy, T.G. 2002. Vitamin E supplementation improves bovine embryo development in vitro. *Reproduction Abstr. Ser.* 28:15 -16.

- Rios, M.C. 2003. El estrés oxidativo y el destino celular. *Rev. Químicas* 2(1). Disponible en: www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar. *Revista Electrónica de Ciencia y Educación*.
- Rieger, D., Loskutoff, N.M., and Betteridge, K.J. 1992. Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced in vitro. *Reprod. Fert. Dev.* 4: 547 – 557.
- Rieger, D., Luciano, A.M., Modina, S., Pocar, P., Lauria, A., and Gandolfi, F. 1998. The effects of epidermal growth factor and insulin – like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes in vitro. *J. Reprod. Fert.* 112: 123 – 130.
- Rizos, D., Lonergan, P., Boland, M.P., Arrayo-García R., Pintado, B., De La Fuente, J., and Gutierrez-Adán, A. 2002. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: Implications for Blastocysts quality. *Biol. Reprod.* 66: 589 – 595.
- Rizos, D., Gutierrez – Adán A., Perez – Garnelo, S., De La Fuente, J., Boland, M.P., and Lonergan, P. 2003. Bovine Embryo Culture in the presence or absence of serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* 68(1): 236 – 243.
- Rizos, D., Clemente, M., Bermejo-Alvarez, P., De La Fuente, J., Lonergan, P., and Gutiérrez-Adán, A. 2008. Consequences of in vitro culture condition on embryo development and quality. *Reprod. Domest. Anim.* 43 (4): 44 – 50.
- Rocha - Frigoni, N.A.S., Leao, B.C.S., Nogueira, E., and Mingoti, G.Z. 2012 a. Intracellular reactive oxygen species in bovine embryos cultured in vitro with catalase under various oxygen tensions. *Reprod. Fertil. Dev.* 24: 157-158. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1071/rdv24n1ab90>.
- Rocha - Frigoni, N.A.S., Leao, B.C.S., Nogueira, E., and Mingoti, G.Z. 2012 b. Supplementation with antioxidants during maturation increases resistance to oxidative stress in bovine embryos produced in vitro but not improves cryotolerance. *Anim. Reprod.* 9: 681.

- Rocha - Frigoni, N.A.S., Leao, B.C.S., Nogueira, E., Accorsi, M.F, and Mingoti, G.Z. 2014. Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and apoptosis status are not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos produced in vitro in the presence of antioxidants. *Reprod. Fertil. Dev.* 26 (6): 797 – 805.
- Saeki, K., Hoshi, M., Leibfried – Rutledge, M.L., and First, N.L. 1991. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol. Reprod.* 44(2): 256 – 260.
- Sakaguchi, M., Dominkop, T., Leibfried-Rutledge, M.L., Nagai, T., and First NL. 2000. A combination of EGF and IGF – 1 accelerates the progression of meiosis in bovine follicular oocytes in vitro and fetal calf serum neutralizes the acceleration effect. *Theriogenology.* 54(8): 1327 – 1342.
- Sakagushi, M.; Dominko, T.; Yamauchi, N., Leibfreid-Rutledge, M.L., Nagai, T., and First, N.L. 2002. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors in vitro. *Reproduction.* 123(1): 135 – 142.
- Sanches, B.V., Lunardelli, P.A., Tannura, J.H., Cardoso, B.L., Pereira, M.H., Gaitkoshi, D., Basso, A., Arnold, D.R., and Seneda, M.M. 2016. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. *Theriogenology* 85(6): 1147 – 1151.
- Saragusty, J., and Arav, A. 2011. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction.* 141: 1 – 19.
- Seidel, GE. Jr., 2006. Modifying oocytes and embryos to improve the cryopreservation. *Theriogenology*, 65: 228 – 235.
- Serapiao, R.V., Ferreira, W., Ferreira, A., Almeida Camargo, L.S., Torres Gillardi, S.G., Moreira Viana, J.H., Almeida Ramos, A., and Garcia Nogueira, L.A. 2005. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. *Revista Brasileira de ciecia veterinária.* 12 (1/3): 58 – 61.
- Silva, D.S., Pereira, R.B., Navarro, R.B., Rosa, D.C., Pessoa, G.A., Silva, C.A.M., and Rubin, M.I.B. 2010. In vitro production of *Bos taurus indicus* embryos with cysteamine. *Anim. Reprod.* 7 (1): 29 – 34.

- Sirard, MA. 2011. Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. *J. Assits. Reprod. Genet.* Disponible en: doi 10.1007/s10815-011-9554-4.
- Sirisathien, S., Hernandez – Fonseca, H.J., and Brackett, BG. 2003. Influences of epidermal growth factor and insulin – like growth factor – I on bovine blastocyst development in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 77: 21 – 32.
- Sudano, M.J., Rascado, T.D., Tata, A., Belaz, K.R., Santos, V.G., Valente, R.S., Mesquita, F.S., Ferreira, C.R., Araujo, J.P., Eberlin, M.N., and Landim-Alvarenga, F.D. 2016. Lipidome signatures in early bovine embryo development. *Theriogenology.* 86 (2): 472 – 484.
- Sutton, ML. 2003. Effect of In Vivo and In Vitro environments on the metabolism of the cumulus – oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum. Reprod. Update.* 9 (1): 35 – 48.
- Takahashi, M., Nagai, T., Hamano, S., Kuwayama, M., Okamura, N., and Okaro, A. 1993. Effect of thiol compounds on in vitro development and intracelular glutathion content of bovine embryos. *Biol. Reprod.* 49(2): 228 – 232.
- Takahashi, M., Keicho, K., Takahashi, H., Ogawa, H., Schultz, R.M., and Okano, A. 2000. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in vitro cultured bovine embryos by COMET assay. *Theriogenology.* 54(1): 137-145.
- Takahashi, M. 2012. Oxidative stress and redox regulation on In Vitro development of mammalian embryos. *J. Reprod. Dev.* 58(1): 1-9.
- Tamargo – Santos, B.; Herrera – Belén, L, Bello-Alarcón, A., Cuellár, A., González-Rodríguez, H., Sierra-González, G., Morales-González, M., y Ortiz-Zamora, L. 2011. Obtención de fosfolípidos a partir de la lecitina de soya (*Glicine max L*) para usos biomédicos. *Revista Cubana de Química.* Vol. XXIII. No. 3: 5 -14.
- Tarazona, AM., Oliveira – Angel, M., and Lenis Y.Y. 2010. Rol de la mitocondria y el estrés oxidative en el bloqueo del desarrollo de embriones Bovinos producidos in vitro. *Arch. Med. Vet.* 42 (3): 125-133.

- Thompson J.G., Partridge, R.J., Houghton, F.D., Cox, C.I., and Leese, H.J. 1996. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by In Vitro derived bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 106(2): 299 – 306.
- Tirone, E., D'Alessandris, C., Hascall, V.C., Siracusa, G., and Salustri, A. 1997. Hyaluronan synthesis by mouse cumulus cells regulated by interactions between follicle – stimulating hormone (or epidermal growth factor) and soluble oocyte factor (or transforming growth factor beta I). *J. Biol. Chem.* 272(8): 4787 – 4794.
- Turrens, J.F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology.* 552 (2): 335 – 344.
- Ushijima, H., Akiyama, K., and Tajima, T. 2008. Transition of cell numbers in bovine preimplantation embryos: in vivo collected and in vitro produced embryos. *J. Reprod. Dev.* 54(4): 239 – 243.
- Van Soom, A., Van Vlaenderen, I., Mahmoudzadeh, A.R., Deluyker, H., and de Kruif, A. 1992. Comparison rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology.* 38(5): 905 – 919.
- Van Soom, A., Yuan, Y.Q., Peelman, L.J., de Matos, D.G., Dewulf, J., Laevens, H., and de Kruif, A. 2002. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. *Theriogenology.* 57(5): 1453 – 1465.
- Van Wagtenonk – de L., and Haring, R.M. 2000. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology.* 54: 57 – 67.
- Velasquez, M.A. 2011. The role of nutritional supplementation of the outcome of superovulation in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 126: 1 – 10.
- Venerao Gutiérrez, J.R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cub. Med. Milit.* 31 (2): 126 – 133.

- Viana, J.H.M., Siqueira, L.G.B., Palhao, M.P., and Camargo, L.S.A. 2012. Features and perspectives of the Brazilian in vitro Embryos Industry. *Anim. Reprod.* 9(1): 12 – 18.
- Vidal, A.H., Batista, A.M., Bento da Silva, E.C., Arruda Gomes, W., Arruda Pelinca, M., Valcácia Silva, S., and Pessoa Guerra, M. 2013. Soybean lecithin – based extenders as an alternative for goat sperm cryopreservation. *Small ruminant research.* 109(1): 47-51.
- Viuff, D., Palsgaard, A., Rickords, L., Lawson, L.G., Greve, T., Schmidt, M., Avery, B., Hyttel, P., and Thomsen, P.D. 2002. Bovine embryos contain a higher proportion of polyploidy cells in the trophectoderm than in the embryonic disc. *Mol. Reprod. Dev.* 62(4): 483 – 488.
- Woods, E.J.; Benson, J.D., Agca, Y., and Critser, J.K. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology.*, 48(2): 146 – 156.
- Wrenzycki, C., Wells, D., Herrmann, D., Miller, A., Oliver, J., Tervit, R., and Niemann, H. 2001. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocyst. *Biol. Reprod.* 65(1): 309 – 317.
- Yang, C.Y., and Zheng, H.Y. 2012. The impact of linolenic acid on in vitro development of buffalo embryos. *Buffalo Bulletin.* 32: 432 – 435.
- Yoshida, Y., Miyamura, M., Hamano, S., and Yoshida, M. 1998. Expression of growth factor ligand and their receptor mRNAs in bovine ova during in vitro maturation and after fertilization in vitro. *The Journal of veterinary medical science / The Japanese Society of Veterinary Science.* 60(5): 549 – 554.
- Younis, A.L.; Brackett, B.G., and Fagrger-Hosken, R.A. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete. Res.* 23(2): 189 – 201.
- Zeron, Y., Ocheretny, A., Kedar, O., Borochoy, A., Sklan, D., and Arav, A. 2001. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction.* 121(3): 447 – 454.

- Zeron, Y., Slan, D., and Arav, A. 2002. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 61 (2): 271 – 278.
- Zuelke, K.A., and Brackett, B.G. 1990. Luteinizing hormones enhanced in vitro maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. *Biol. Reprod.* 43: 784 – 787.
- Zullo, G., Albero, G., Neglia, G., De Canditiis, C., Bifislo, G., Campanile, G., and Gasparrini, B. 2016. L – ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine in vitro – produced embryos. *Theriogenology.* 85(4): 688-697.