



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

## FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Validación de un sistema para medir el grado de  
peroxidación lipídica en embriones *Bos taurus* y *Bos  
indicus*

T E S I S

PARA EL OBTENER EL GRADO DE:

**MÉDICA VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

ADALINDA HERNÁNDEZ YÁÑEZ

ASESORES:

MVZ PhD CARLOS SALVADOR GALINA HIDALGO

BIOL PhD TATIANA FIORDELISIO COLL

México, D.F.

2015





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Dedico esta tesis:*

*A mis padres, mi ejemplo de esfuerzo y perseverancia.*

*A Bolonia, mi fiel compañera, paciente escucha y mejor amiga. Realmente no te has ido, estas aquí, presente en lo que hago, lo que pienso y lo que soy...*

### **Agradecimientos**

A mis padres, Gloria y Amado, quienes más que de darme la maravillosa oportunidad de vivir, han sido, son y serán mi mejor ejemplo a seguir. Gracias por todo el esfuerzo y dedicación que han invertido en mí.

A mi hermano Noé, por resolverme tantos problemas técnicos, por los consejos, compañía y cariño (a su manera).

A Ana Paula, por siempre estar ahí, en los momentos más felices, así como en los más tristes, sé que siempre puedo contar contigo y sé que sabes que siempre podrás contar conmigo. A Brenda, por su incondicional amistad, el cariño y la confianza. A Mikael por la complicidad, consejos y absoluta amistad. A Zazil y Guadalupe por tantas horas de risas y ocurrencias varias por su amistad, apoyo, ayuda y consejos. Y a todos los amigos que hice durante esta aventura, a aquellos que hicieron mis horas libres más llevaderas, las horas de clase más agradables y a los que compartieron tantas horas de prácticas conmigo, gracias por haber formado parte esto.

Al Dr. Carlos Galina por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo y compartirme su experiencia y sabiduría. Gracias también por brindarme su amistad.

A la Dra. Tatiana Fiordelisis, por su valiosa ayuda y asesoría en la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado, el Dr. Luis Alberto Zarco Quintero, el Dr. Javier de Jesús Valencia Méndez, el Dr. Arturo Federico Olguín y Bernal, y la Dra. Ana Delia

Rodríguez Cortez. Por sus comentarios y correcciones, así como por el tiempo invertido en esta tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, así como a los profesores que participaron en mi formación, por todas las enseñanzas y experiencias compartidas.

Al proyecto PAPITT IN211013 con el título: “Comparación morfológica, uso de antioxidantes y determinación de los grados de peroxidación lipídica durante y post descongelación de los embriones Bos taurus y Bos indicus” por proporcionar el material necesario para la realización de esta tesis.

Y por último, a Bolonia, Sandunga, Ukko, Yola, Romijn, Remo, Tinnitus, Aina y Albina, por acompañarme fielmente en esta gran aventura, constantes durante las largas horas nocturnas de trabajos y estudio, silenciosos maestros, primeros pacientes e incondicionales amigos. Por enseñarme que todo ser viviente tiene un gran valor sin importar que tan pequeño es.

*“Sin duda no hay progreso.”*  
**Charles Darwin**

**CONTENIDO**

Resumen .....	1
Introducción .....	2
Hipótesis .....	12
Objetivo .....	12
Material y métodos: .....	13
Muestras .....	13
Detección de la peroxidación lipídica .....	14
Protocolo experimental.....	15
Observación y análisis .....	18
Resultados.....	19
Fase 1 .....	19
Fase 2 .....	21
Fase 3 .....	21
Fase 4 .....	22
Fase 5.....	24
Análisis de la Intensidad de fluorescencia .....	26
Discusión .....	29
Referencias: .....	34

## Resumen

HERNÁNDEZ YÁÑEZ ADALINDA. Validación de un sistema para medir el grado de peroxidación lipídica en embriones *Bos taurus* y *Bos indicus* (bajo la dirección de: MVZ, PhD Carlos Salvador Galina Hidalgo y BIOL, PhD Tatiana Fiordelisis Coll)

La tasa de éxito gestacional después de una transferencia de embriones criopreservados es diferente entre las 2 especies de bovinos empleadas para la producción pecuaria, siendo más exitosa en *Bos taurus* que en *Bos indicus*. Una de las principales causas de esta problemática pudiera ser el hecho de que la cantidad y morfología de las gotas lipídicas dentro de las células embrionarias difiere en ambas especies, lo cual generaría una discrepancia importante en la manera en que los embriones se recuperan después de la descongelación, así como un aumento de reacciones de peroxidación lipídica precipitadas por el daño celular después de la descongelación. Sin embargo, no se ha documentado ningún sistema que nos permita conocer si esto es verídico, por lo que el objetivo del presente estudio fue estandarizar un sistema para la detección de la peroxidación lipídica en embriones bovinos. Se utilizó un kit Click-iT<sup>®</sup> con Alquino de Linoleamida en 13 embriones *Bos taurus* y 16 embriones *Bos indicus*, clasificados de acuerdo a los criterios establecidos por la IETS previamente a su congelación. Se encontró que el kit es capaz de detectar la peroxidación lipídica, pero fue necesario proporcionar una fuente externa de ácido linoleico y de esta forma detectar la presencia de sustancias capaces de provocar estrés oxidativo dentro del embrión y, a su vez, la capacidad del embrión de detener este proceso por medio de antioxidantes endógenos.

## **Introducción**

La primera transferencia de embriones (TE) exitosa fue realizada por Walter Heape en 1890, quien desarrolló una técnica en embriones de conejo, la cual consistía en pincharlos con la punta de una aguja y transferirlos inmediatamente a la receptora sin que hubiera un paso intermedio como colocarlos en un medio (Heape, 1897). Posteriormente, durante los años 1930's y 1940's Warwick y su equipo realizaron importantes trabajos sobre la transferencia embrionaria en ovejas y cabras (Betteridge, 1981, 2003), pero fue Umbaugh en 1949 quien reportó por primera vez una TE exitosa en bovinos, produciendo 4 gestaciones; sin embargo, los animales abortaron antes de finalizar el periodo de gestación.

Mapletoft (2013) en una revisión de literatura sobre la historia de la TE documentó que el primer becerro resultado de una TE nació en 1951 en la Universidad de Wisconsin. Rowson y su equipo desarrollaron mucha de la tecnología que posteriormente sería utilizada para la TE comercial. Estos trabajos pioneros en el tema dieron pauta al primer curso internacional de transferencia de embriones en bovinos, que se llevó a cabo en Cambridge, Inglaterra en 1972, el cual fue preámbulo para fundar la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS por sus siglas en inglés) instituida en 1974 y que rápidamente se convirtió en el principal foro científico y de discusión sobre la transferencia embrionaria y los campos asociados (Betteridge, 2003).



En sus inicios la TE estaba limitada a producir embriones en vacas nombradas donadoras y transferirlos inmediatamente a vacas denominadas receptoras. Sin embargo, con esta metodología surgieron problemas como que el número de receptoras muchas veces era menor que el número de embriones colectados o, por el contrario, el número de receptoras era mayor que los embriones obtenidos. Debido a esto, fue necesario desarrollar una técnica que permitiera conservar los embriones por un periodo extendido de tiempo sin perder su capacidad de desarrollo. Es así como la criopreservación embrionaria cobró importancia ya que brinda diversas ventajas tanto desde un punto de vista biológico como económico. Por ejemplo, permite reducir los costos de importación de material genético, previene la diseminación de enfermedades exóticas y permite crear bancos de embriones para la preservación de razas y especies en peligro de extinción (Celestinos & Gatica, 2002). La criopreservación y la transferencia de embriones congelados-descongelados resulta en porcentajes de gestación cercanos a los obtenidos a partir de la transferencia directa de embriones frescos (Mapletoft, 2013).

En los últimos 20 años la TE ha crecido para convertirse en una industria madura y activa a nivel mundial. Anualmente son producidos más de 750,000 embriones y más de 450,000 embriones usando técnicas in vitro (Mapletoft, 2013). A pesar de que algunos autores (Perry, 2013) han mostrado que el uso de la TE es una herramienta importante para el mejoramiento del ganado, se ha señalado que la mayoría de los embriones producidos con esta técnica son provenientes de regiones templadas y no de los trópicos (Hasler, 2003), lo que puede deberse a la

baja tasa de éxito gestacional por TE que se obtiene en las razas de ganado presentes en las regiones tropicales. La literatura señala que los porcentajes de gestación que se logran cuando se realiza TE en ganado *Bos taurus* (Bt) son comparativamente superiores a los obtenidos en el ganado de tipo *Bos indicus* (Bi) (Barati et al., 2007; Rao et al., 2009; Rao et al., 2010; Alarcón et al., 2010). Una posible explicación de esta discordancia puede deberse a una diferencia señalada en estudio de Zanenga (1993), quien observó que los embriones Bi al ser congelados no reaccionan de la misma manera que los Bt, y postuló que esta discrepancia podía deberse a una diferencia en la cantidad de gotas lipídicas dentro de las células embrionarias de ambas especies.

La producción de embriones también puede afectarse si las condiciones medioambientales no son favorables. Marquez et al., (2005) demostraron que el número de embriones evaluados por su resistencia a la congelación y su grado de apoptosis, aumentó si los embriones fueron producidos en la primavera en comparación a los producidos en otoño, incluso usando las mismas vacas donadoras.

Antes de ser congelados, los embriones son evaluados por sus características físicas, asignándolos a una de las 3 categorías que sugiere el manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (Stringfellow y Seidel, 1998): Buenos (calidad 1), regulares (calidad 2) y malos (calidad 3). El método de clasificación de embriones tiene cierta subjetividad, por lo que los embriones producidos a escala industrial pueden ser sujetos a la variación del criterio de

asignación cuando son seleccionados para su congelación (Marquez-Alvarado et al., 2004), Farin et al. (1995) encontraron que, incluso técnicos especializados, después de evaluar 40 embriones en diferentes estados de desarrollo y grados de degeneración, concordaron solo en un 68.5% de los diagnósticos, teniendo mayor dificultad en diferenciar entre los embriones calificados como buenos y regulares.

Después de ser congelados y descongelados, la calidad de los embriones puede verse afectada de diferentes formas. Los embriones congelados en nitrógeno líquido por un largo periodo de tiempo, tuvieron incrementos significativos en el número de células apoptóticas en comparación con los que fueron congelados y a la brevedad procesados. En embriones clasificados como de calidad 2 o regular, se observó un incremento aun mayor en el número de células apoptóticas cuando permanecieron congelados por mucho tiempo (Marquez et al., 2005). En otro estudio, Rondeau et al. (1995), evaluaron el metabolismo de los embriones, encontrando que en el 47% de los considerados como de buena calidad, la actividad metabólica era anormal, sugiriendo que por medio de la evaluación estereoscópica no es posible detectar algunos defectos celulares. En condiciones tropicales, este problema se acentúa debido a que el estrés generado por las altas temperaturas, causa que la respuesta a la superovulación sea variable y resulte en un alto número de embriones anormales o subdesarrollados (Kafi y McGowan, 1997).

La congelación embrionaria sigue siendo un método práctico que permite detener los procesos metabólicos celulares mediante la disminución de temperatura y el

uso de criopreservadores que deshidratan parcialmente las células, con lo que se evita lesionar los blastómeros por la formación de cristales (Niemann, 1991; Wolfe and Bryant, 1999). Sin embargo, se ha observado que la congelación de embriones es problemática en Bi debido a que los embriones presentan una mayor cantidad de gotas lipídicas con respecto a los Bt (Lopez-Damian et al., 2013), esto provoca que un embrión Bi clasificado como de calidad 1 (bueno), sea similar a un Bt calidad 2 (regular) (López-Damián et al., 2012). En cuanto al tamaño de las gotas lipídicas, las células de los embriones Bi presentan gotas más pequeñas que las de Bt (Lopez-Damian et al., 2013). Sin embargo, la caracterización y efecto de las gotas lipídicas en la célula demanda mayor investigación.

Tarin y Trounson, (1993), Watson, (2000) y Gupta et al., (2010) han informado que el tamaño, cantidad y morfología de las gotas lipídicas afectan la viabilidad de las células después del proceso de congelación debido a la peroxidación lipídica, la cual está considerada como el principal mecanismo molecular involucrado en el daño oxidativo a las estructuras celulares, así como en el proceso de toxicidad que conlleva a la muerte celular.

La peroxidación lipídica es una reacción en cadena que se inicia por la sustracción del hidrógeno o la adición de un radical de oxígeno, resultando en el daño oxidativo de los ácidos grasos por un reordenamiento de las dobles ligaduras y una eventual destrucción de los lípidos membranales, lo que genera una variedad de productos de degradación que incluyen: alcoholes, cetonas, alcanos, aldehídos

y éteres (Dianzani y Barrera, 2008), estos productos son citotóxicos y resultan en estrés oxidativo y apoptosis (Repetto, 2012).

Durante el metabolismo normal de las células se generan especies reactivas de oxígeno (ERO), que son moléculas altamente reactivas, entre las que se encuentran los iones de oxígeno, los radicales libres y los peróxidos. Una característica en común entre las diferentes ERO es su capacidad de causar daño oxidativo a las proteínas, al ADN y a los lípidos. Las células poseen un sistema de defensa antioxidante cuya función es aminorar los efectos negativos de las ERO. A este sistema pertenecen enzimas como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la catalasa. Si este sistema no es capaz de detener las reacciones oxidativas causadas por las ERO, sucederán procesos como la peroxidación lipídica, causando daño celular y disminuyendo la viabilidad de las células (Fig 1.1).

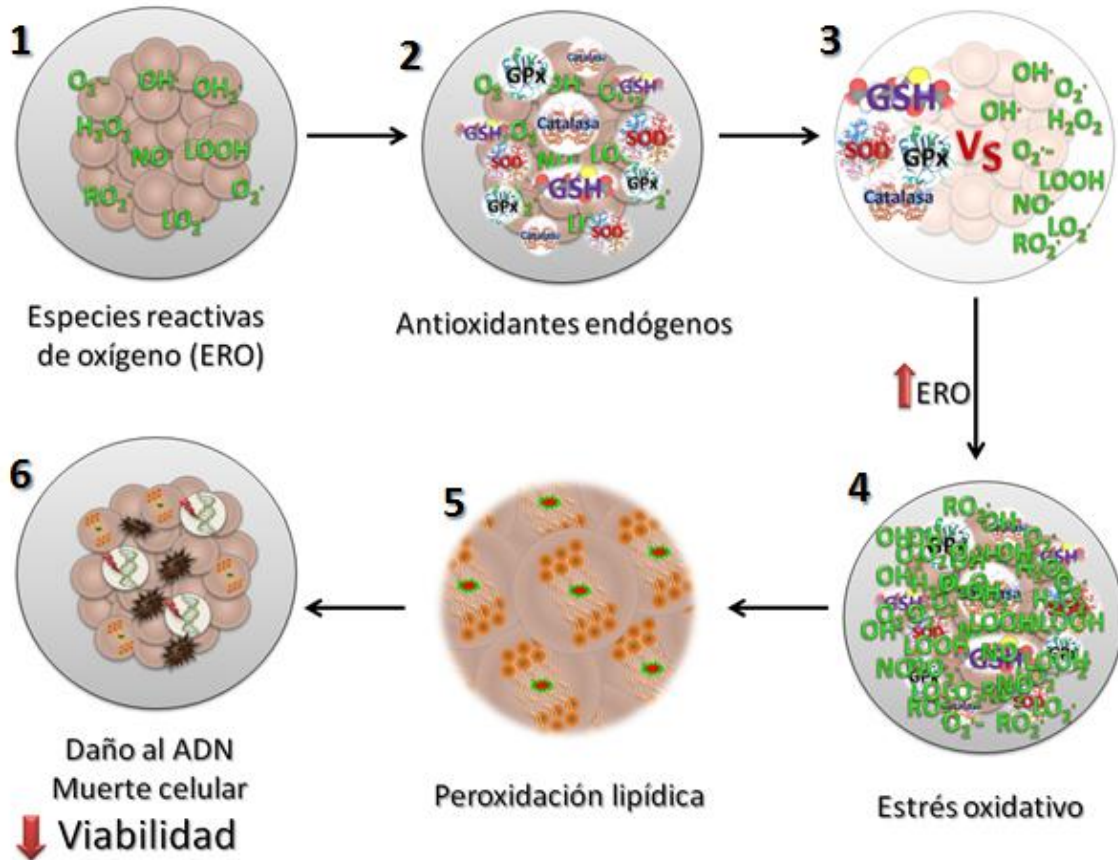


Figura 1.1: Diagrama de flujo de la peroxidación lipídica. En la parte 1 se muestran las ERO, en la 2 se observan antioxidantes endógenos, entre ellos la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la catalasa, en la 3 se muestra que los antioxidantes endógenos tratarán de aminorar el potencial daño de las ERO, en la 4 las ERO han aumentado por lo que los antioxidantes endógenos no son suficientes para contrarrestar dicho efecto negativo y sucede la peroxidación lipídica (5) lo que resulta en el daño a las moléculas de ADN, muerte celular y disminución de la viabilidad (6).

En los embriones *Bos indicus*, al haber una mayor cantidad de gotas lipídicas (Lopez-Damian et al., 2013), la peroxidación podría ser mayor, generando un cambio en la flexibilidad de la membrana de las células y aumentando la formación de cristales que, a su vez, provocarían muerte celular y una menor posibilidad de

eclosión de la zona pelúcida. Debido a lo anterior, es importante determinar el grado de peroxidación lipídica en embriones Bt y Bi para que en un futuro sea posible realizar comparaciones entre estas dos especies.

Sin embargo, al revisar la literatura no fue posible encontrar la descripción de ninguna técnica para medir la peroxidación lipídica en embriones bovinos. Existen kits comerciales especializados para la medición de cambios degenerativos en las células, tal es el caso del kit Click-iT<sup>®</sup> LAA. Éste kit incluye entre sus reactivos un compuesto alquino que contiene ácido linoleico (Alquino de Linoleamida, LAA), un ácido graso polinsaturado oxidable, que al incubarse con las células se incorpora en las membranas celulares. Otro componente del kit es el hidroperóxido de cumeno, que es un oxidante que ha sido previamente utilizado para evaluar los efectos de los radicales libres y productos intermedios reactivos de oxígeno, principalmente en estudios que evalúan el efecto del estrés oxidativo en varios sistemas biológicos (Levine, 1983; Ayala et al., 1996). Esta sustancia al ser agregada a las células, provoca que el LAA se oxide y produzca ácido 9- y 13-hidroperoxi-octadecadienoico (HpODE). Dichos hidroperóxidos se descomponen en múltiples  $\alpha$ ,  $\beta$ -aldehídos *insaturados*, los que fácilmente modifican las proteínas en las cadenas laterales nucleofílicas. Estas proteínas modificadas que contienen alquinos pueden detectarse posteriormente usando la tecnología Click-iT<sup>®</sup> (Figura 1.2). Éste kit utiliza como sustrato el ácido linoleico, que es el ácido graso poli-insaturado que se encuentra con mayor abundancia en los mamíferos, y sus residuos, producto de la peroxidación lipídica, posiblemente son los responsables de la mayoría de los carbonilos proteicos derivados de los lípidos. El kit Click-iT<sup>®</sup>

LAA ha sido utilizado para analizar los niveles de peroxidación lipídica en embriones de ratón *in vivo* e *in vitro* (Komatsu et. al., 2014). En los embriones *in vivo*, se observó una peroxidación menor que en los embriones *in vitro*, lo que sugiere que en estos últimos, existe una aceleración del proceso de peroxidación lipídica que no es visible en la evaluación de los embriones utilizando microscopía estereoscópica.

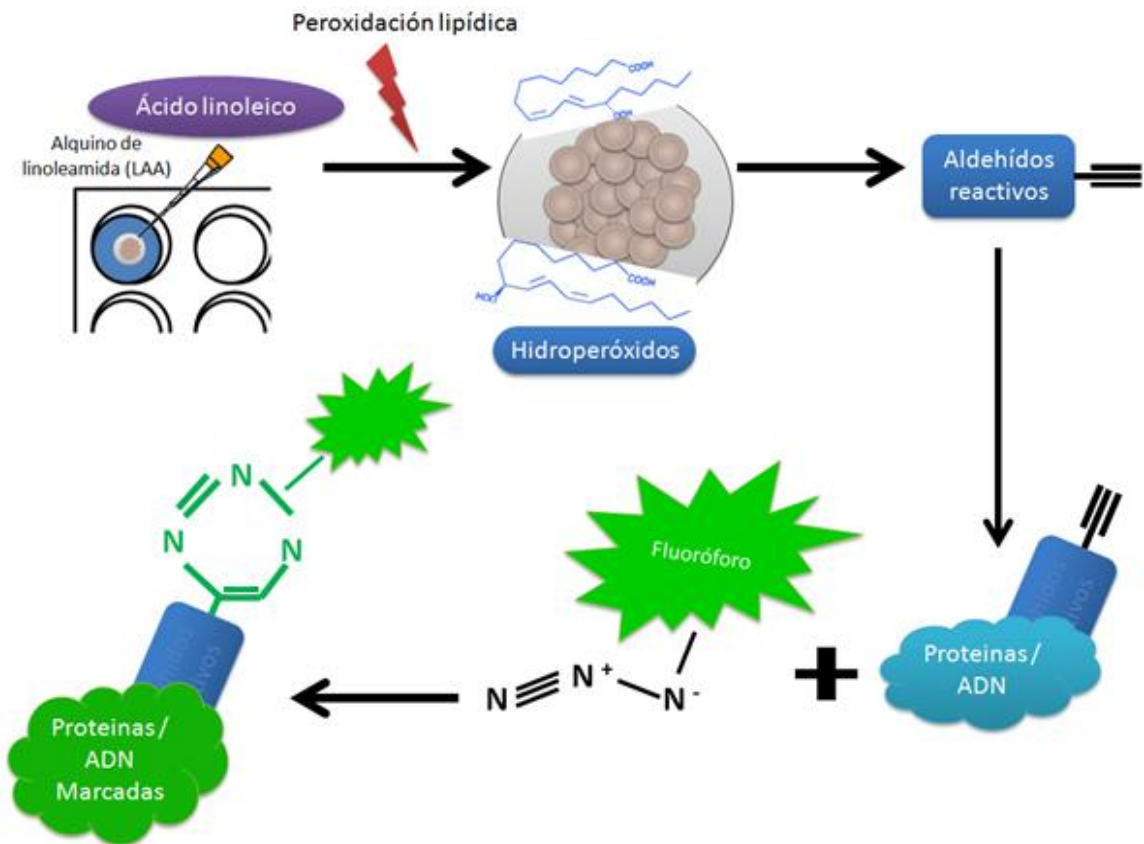


Figura 1.2: Diagrama de flujo del funcionamiento del kit Click-iT® LAA: Al añadir el ácido linoleico, este interactuará con las moléculas oxidativas dentro del embrión (ERO), generando hidropéroxidos los cuales se convertirán en aldehídos reactivos y modificarán a las proteínas. Estas modificaciones permitirán que el fluoróforo se una a ellas y puedan ser detectadas.



Como esta técnica ha sido utilizada para evaluar la peroxidación lipídica en embriones de ratón pero no en bovinos, es importante estandarizarla para conocer el grado de peroxidación lipídica en embriones bovinos y adaptarla para su utilización en futuros estudios que permitan desarrollar tratamientos para prevenir este fenómeno en el proceso de congelación.

## **Hipótesis**

Es posible utilizar la técnica del kit Click-iT<sup>®</sup> con Alquino de Linoleamida para medir la peroxidación lipídica en embriones bovinos.

## **Objetivo**

Estandarizar la técnica del kit Click-iT<sup>®</sup> con Alquino de Linoleamida para medir la peroxidación lipídica en embriones bovinos (*Bos taurus* y *Bos indicus*).

## Material y métodos:

### Muestras

Se utilizaron 13 embriones *Bos taurus*: 7 de buena calidad (calidad 1) y 6 de calidad regular (calidad 2) y mala (calidad 3) y 16 embriones *Bos indicus*: 8 de calidad 1 y 8 de calidad 2 y 3. Todos los embriones fueron conservados en etilenglicol, congelados y mantenidos en nitrógeno líquido. Los embriones fueron clasificados de acuerdo a los criterios establecidos por la IETS previamente a su congelación.

Los embriones *Bos taurus* procedieron de hembras adultas Holstein Friesian localizadas en un cooperativa lechera situada en Tizayuca, Hidalgo, entre los paralelos 19° 50' y 19° 55' latitud norte y entre 90° 00' y 99° 00' longitud oeste, a una altura de 2,260 m sobre el nivel del mar. En ésta región el clima es templado con una media anual de 14.9°C y una precipitación pluvial de 60 mm.

Los embriones *Bos indicus* fueron colectados de hembras adultas Brahman ubicadas en la unidad de producción "El Clarín" que pertenece a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, localizada en Tlapacoyan, Veracruz. Esta unidad se encuentra en la parte central del estado de Veracruz a 19° 58' latitud norte y 97° 13' longitud oeste a una altitud de 151 m sobre el nivel del mar. El clima de esta área es cálido húmedo con una

temperatura media anual de 23.4°C y una precipitación pluvial media de 1,840 mm distribuidos en aproximadamente 10 meses del año.

### **Detección de la peroxidación lipídica**

Se utilizó un kit Click-iT<sup>®</sup> (molecular probes<sup>®</sup> por Life Technologies<sup>™</sup>) para la detección de la peroxidación lipídica a partir de Alquino de Linoleamida (LAA).

Buffer fosfato salino (PBS, pH 7.2–7.6), solución de fijación (formaldehído al 3.7% en PBS) y solución de permeabilización (Triton<sup>®</sup> X-100 al 0.5%), medio Holding (ViGro<sup>™</sup> Holding Plus, Canadá) y agua desionizada.

### **Preparación de las soluciones stock**

La solución stock 50-mM de Click-iT<sup>®</sup> LAA fue preparada añadiendo 25 µl de DMSO anhidro a un vial de Click-iT<sup>®</sup> LAA (componente A) y se homogenizó.

Para la solución stock 10X de Click-iT<sup>®</sup> Aditivo Buffer se agregaron 2 mL de agua desionizada a una botella de Click-iT<sup>®</sup> Aditivo Buffer (componente E) y se mezcló homogéneamente.

La solución stock 100-mM de hidroperóxido de cumeno fue hecha agregando 1 µl de hidroperóxido de cumeno (componente F, 5.4 M) a 54 µl de etanol al 100%.

## **Preparación de soluciones de trabajo**

Estas soluciones fueron preparadas el mismo día en que se utilizaron.

La solución de trabajo de Click-iT<sup>®</sup> Buffer de reacción fue preparada agregando 100  $\mu$ L del buffer a 1000  $\mu$ L de agua desionizada. Para la solución de trabajo de Click-iT<sup>®</sup> Aditivo Buffer se agregaron 100  $\mu$ L de la solución stock 10X Click-iT<sup>®</sup> Aditivo Buffer a 1000  $\mu$ L de agua desionizada. La solución stock de Click-iT<sup>®</sup> LAA fue diluida en medio Holding (ViGro<sup>™</sup> Holding Plus, Canadá) a una concentración final de 50  $\mu$ M.

Para la solución de trabajo de hidropéroxido de cumeno se añadió 1  $\mu$ L de solución stock de hidropéroxido de cumeno a 999  $\mu$ L de medio Holding.

## **Protocolo experimental**

Los embriones fueron extraídos del termo de nitrógeno líquido, se descongelaron dejándolos 5 segundos a temperatura ambiente y, posteriormente, a baño maría a 30°C por 30 segundos (George et al., 1991).

Inmediatamente después de la descongelación, se extrajo el embrión de la pajilla y se colocó en una caja de Petri, donde fue lavado en medio Holding. Posteriormente los embriones fueron pasados a placas de poliestireno de 6 pozos donde fueron divididos en tres grupos: control positivo, a los cuales se les agregó

LAA y se les indujo la peroxidación lipídica con hidroperóxido de cumeno; control negativo, los cuales fueron fijados con Karnovsky (solución de fijación de paraformaldehido-glutaraldehido 3.7% en Buffer salino, PBS pH 7.2–7.6) sin someterlos a ningún tratamiento previo; y experimentales, en los cuales solo se adicionó el sustrato (LAA) para ser peroxidado por los mecanismos intrínsecos de los embriones.

Los embriones se fueron asignando a los grupos y sometiendo a sus respectivos tratamientos como de describe en la sección de resultados,

### **Identificación de las células con Click-iT<sup>®</sup> LAA e inducción de la peroxidación lipídica en los embriones controles positivos**

A los embriones controles positivos y experimentales fue necesario adicionarles 40  $\mu$ L de solución stock Click-iT<sup>®</sup> LAA diluida con medio Holding a una concentración final de 50  $\mu$ M, esto con la finalidad de proporcionar el sustrato necesario para la reacción de peroxidación. Adicionalmente, a los embriones denominados control positivo, se les agregó 40  $\mu$ L de hidroperóxido de cumeno a una concentración final de 100  $\mu$ M y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con el propósito de inducir la peroxidación lipídica.

En todos los casos, los embriones fueron lavados 3 veces con medio Holding para remover la solución e inmediatamente después de este procedimiento, se procedió a la fijación y permeabilización.

## **Fijación y permeabilización de los embriones**

Se añadieron 40  $\mu$ L de Karnovsky (solución de fijación de paraformaldehído-glutaraldehído 3.7% en Buffer salido, PBS pH 7.2–7.6) y se incubaron por 1 hora en refrigeración (4°C). Pasado éste tiempo, se removió la solución de fijación y los embriones fueron lavados 3 veces con PBS.

La solución de lavado fue removida y se añadieron 40  $\mu$ L de solución de permeabilización (0.5% Triton<sup>®</sup> X-100 en PBS) y se procedió a incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Finalmente, para bloquear los sitios de unión inespecífica, se agregó 1% de BSA (albúmina de suero bovino) en PBS y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos.

## **Detección Click-iT<sup>®</sup> LAA**

Se preparó la solución de reacción Click-iT<sup>®</sup> de acuerdo a las instrucciones del fabricante; ésta solución, debe ser utilizada durante los primeros 15 minutos después de haberla preparado.

Después de la remoción de la solución de bloqueo las muestras se lavaron 3 veces con PBS y a continuación, se añadieron 500  $\mu$ L de Click-iT<sup>®</sup> solución de reacción y se distribuyó homogéneamente sobre el embrión y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos protegiéndolo de la luz.

Finalmente, se removió la solución de reacción y las muestras fueron lavadas 3 veces con BSA al 1% en PBS y 3 veces con PBS. Al terminar este proceso se procedió a remover la solución de lavado para poder montar el embrión en cubreobjetos, previamente preparados con poly-L-Lisina. Durante el proceso de montaje y para evitar que los embriones se aplastaran entre los cubreobjetos se emplearon refuerzos para carpeta de plástico transparente, y por último se les colocó una gota de DAKO (medio de montaje para fluorescencia).

El Click-iT<sup>®</sup> LAA utiliza Alexa Fluor<sup>®</sup> 488, una azida verde fluorescente que reacciona con alquinos terminales, y que tiene un espectro de emisión/excitación máxima aproximada de 495/519 nm.

### **Observación y análisis**

Los embriones fueron observados utilizando un microscopio multifotónico de barrido láser, tipo Upright BX61WI, con un objetivo de inmersión en agua de 25X y láser de longitud de onda de excitación de 690-1040nm y 510 nm de emisión, en el Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Las imágenes obtenidas se analizaron con el procesador de imágenes Fiji /ImageJ, NIH, y se obtuvo el promedio de intensidad de fluorescencia para cada embrión.



## **Resultados**

Los resultados fueron divididos en fases conforme a como se llevó a cabo el experimento, las cuales se explican más adelante. Se consideró que la reacción del kit fue positiva cuando se pudo observar mayor señal de fluorescencia en los embriones comparados con los controles negativos.

### **Fase 1**

La primera fase contempló la realización de controles positivos y negativos con el objetivo de probar la viabilidad del kit. Un embrión Bt y un Bi calidad 1 fueron sometidos al protocolo original descrito en el kit. A los controles positivos se les añadió hidróperóxido de cumeno como oxidante. Posteriormente fueron observados y comparados con un embrión Bt y un Bi sin someter a tratamiento (controles negativos). En los controles positivos se observó fluorescencia (Figura 5.1). En los controles negativos, como era de esperarse, no se detectó la fluorescencia (Figura 5.2).

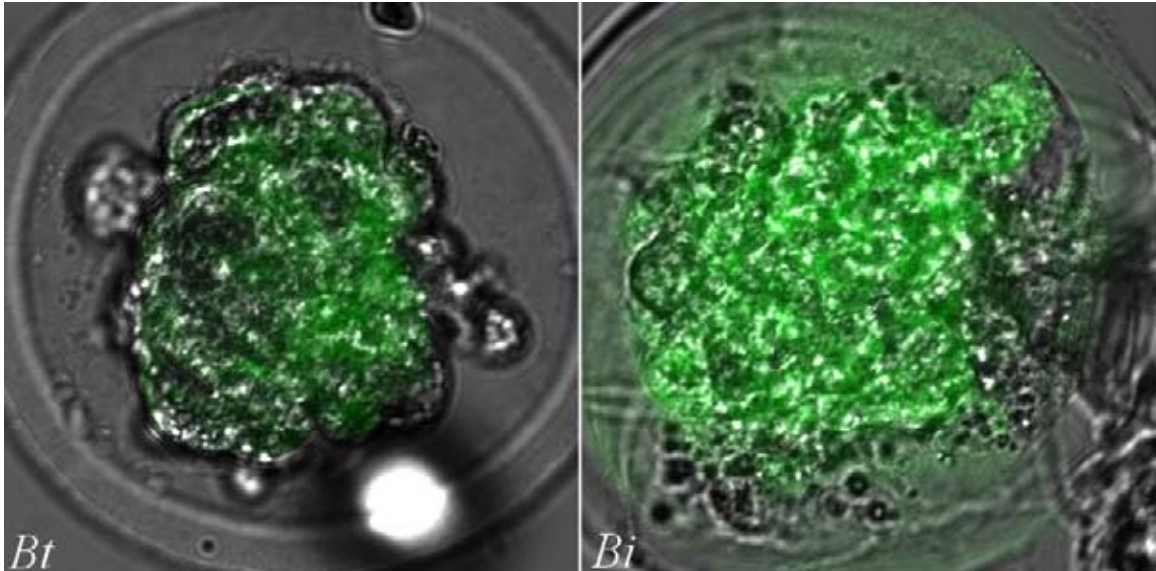


Figura 5.1: Imágenes de fluorescencia de los controles positivos en embriones *Bos taurus* (panel izquierdo) y en *Bos indicus* (panel derecho).

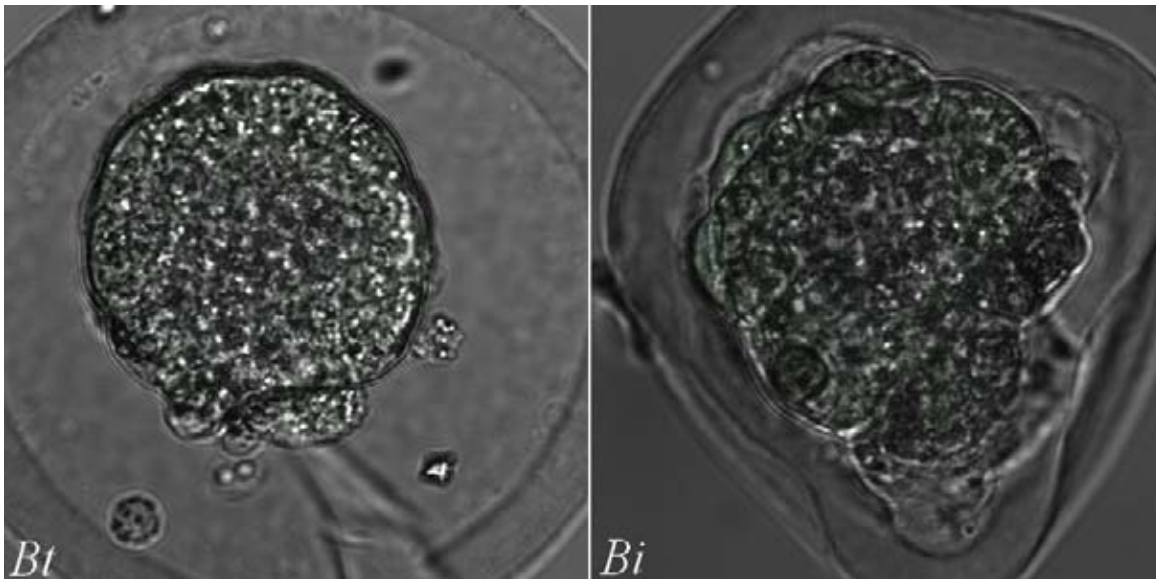


Figura 5.2: Imágenes de Fluorescencia de los controles negativos en embriones *Bos taurus* (panel izquierdo) y en *Bos indicus* (panel derecho).

Una vez observada la funcionalidad de la técnica del kit Click-iT LAA en los embriones control, se continuó con una segunda fase donde se tuvo como objetivo evaluar si el kit era capaz de medir la peroxidación lipídica propia del embrión.

## **Fase 2**

Se utilizaron 3 embriones Bi y 2 Bt calidad 2, los cuales fueron sometidos al tratamiento del kit Click-iT LAA. Un Bi fue usado como control positivo añadiéndole LAA e hidropéroxido de cumeno como oxidante. A los 4 restantes, únicamente se les adicionó ácido linoleico.

El control positivo manifestó fluorescencia, en el resto de los embriones no fue posible detectar ningún tipo de reacción. Por ende se repitió el protocolo para validar la ausencia de fluorescencia.

## **Fase 3**

En la tercera fase 4 embriones Bi y 2 Bt fueron sometidos al tratamiento del kit Click-iT LAA, sin agregarles LAA. No se observó fluorescencia en los 6 embriones.

Es probable que los resultados obtenidos en la fase 2 y 3 sean debidos a que el kit está diseñado para detectar los cambios por la peroxidación lipídica en el ácido linoleico y, los embriones bovinos al no tener la suficiente cantidad de este ácido,

no pudieron mostrar dichos cambios. Debido al resultado no esperado se procedió a realizar un nuevo análisis.

#### **Fase 4**

La fase 4 contempló la utilización de 8 embriones, 4 Bt y 4 Bi de calidad regular (2).

Un embrión Bi y un Bt fueron usados como controles positivos, se les agregó LAA e hidroperóxido de cumeno durante una hora.

Un embrión Bi y un Bt fueron usados como controles negativos, fijados con Karnovsky y montados para su observación.

Dos embriones Bi y dos Bt fueron sometidos al kit Click-iT LAA, sin inducir peroxidación, pero añadiéndoles LAA por una hora.

Los embriones controles positivos mostraron fluorescencia (Figura 5.3), al igual que los embriones que solo habían sido incubados con LAA, sin embargo su señal fluorescente fue menor (Figura 5.4). Los embriones controles negativos no mostraron fluorescencia (Figura 5.5).

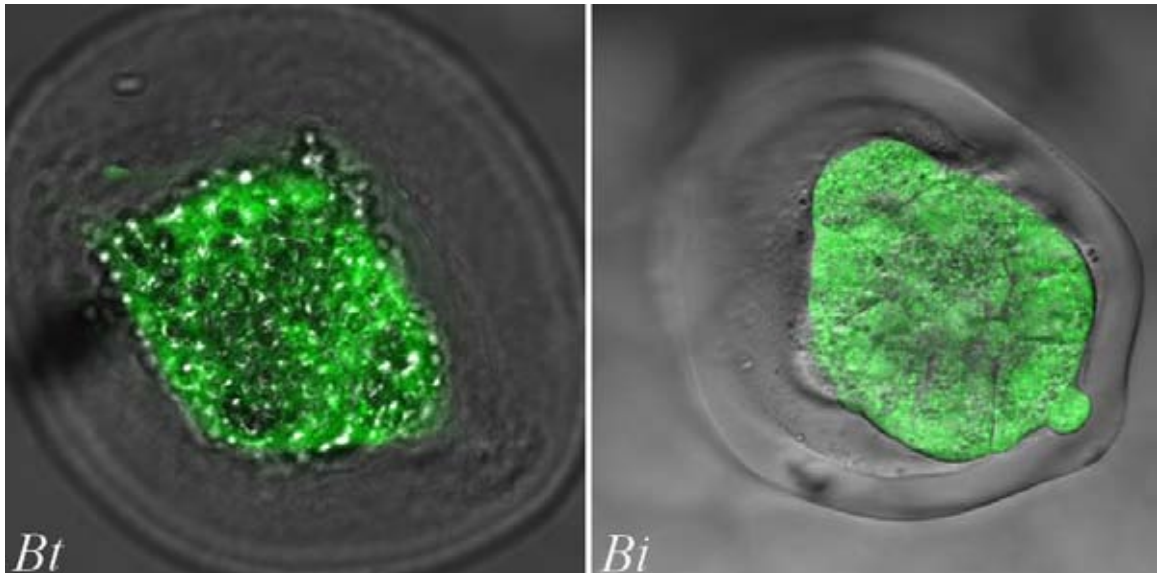


Figura 5.3: Imágenes de fluorescencia en controles positivos clasificados de calidad regular. Izquierda *Bos taurus*, derecha *Bos indicus*.

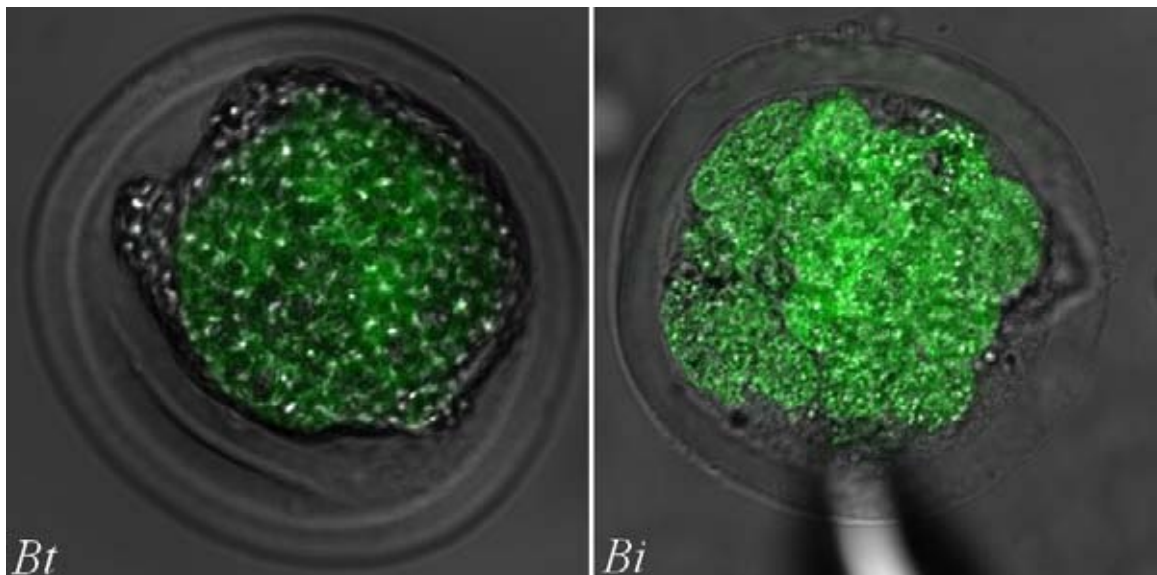


Figura 5.4: Imágenes de fluorescencia de embriones incubados con LAA, clasificados de calidad regular. Izquierda *Bos taurus*, derecha *Bos indicus*.

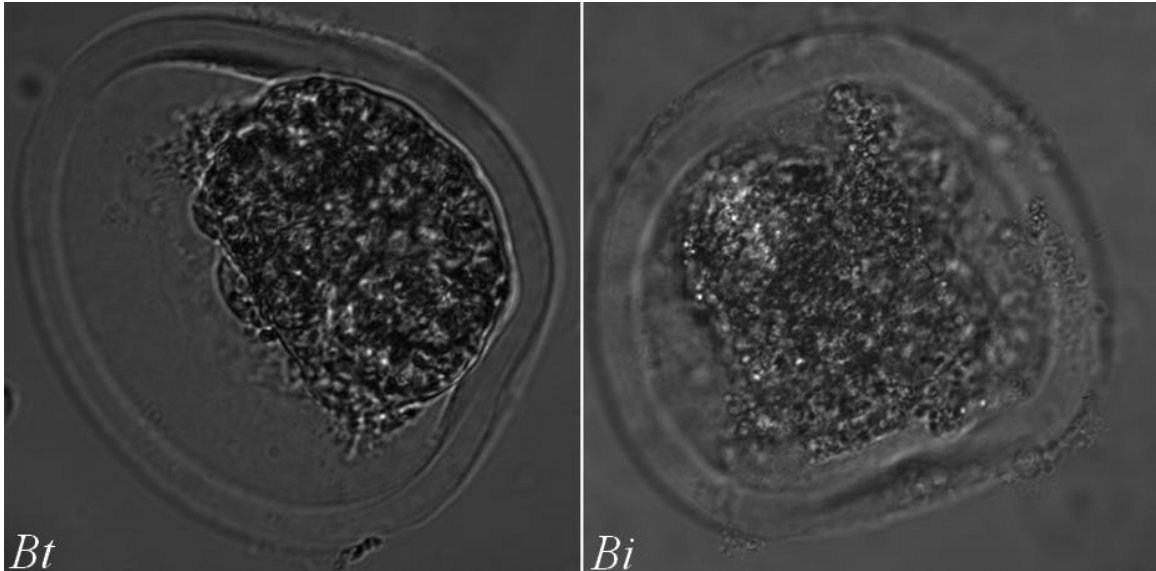


Figura 5.5: Imágenes de fluorescencia de embriones controles negativos, clasificados de calidad regular. Izquierda *Bos taurus*, derecha *Bos indicus*.

Al observar un resultado positivo en embriones de calidad regular (2), se decidió repetir el protocolo en embriones de buena calidad (1) para ver el comportamiento del kit en estos.

### **Fase 5**

En esta fase se utilizaron 6 embriones, 3 Bt y 3 Bi de calidad 1, los cuales fueron procesados siguiendo el mismo protocolo que en la fase 4.

Los embriones controles positivos mostraron fluorescencia (figura 5.6). Los embriones experimentales incubados con LAA presentaron fluorescencia, pero con una señal menor que los controles positivos (figura 5.7). Los embriones

controles negativos no presentaron ningún tipo de reacción fluorescente (figura 5.8).

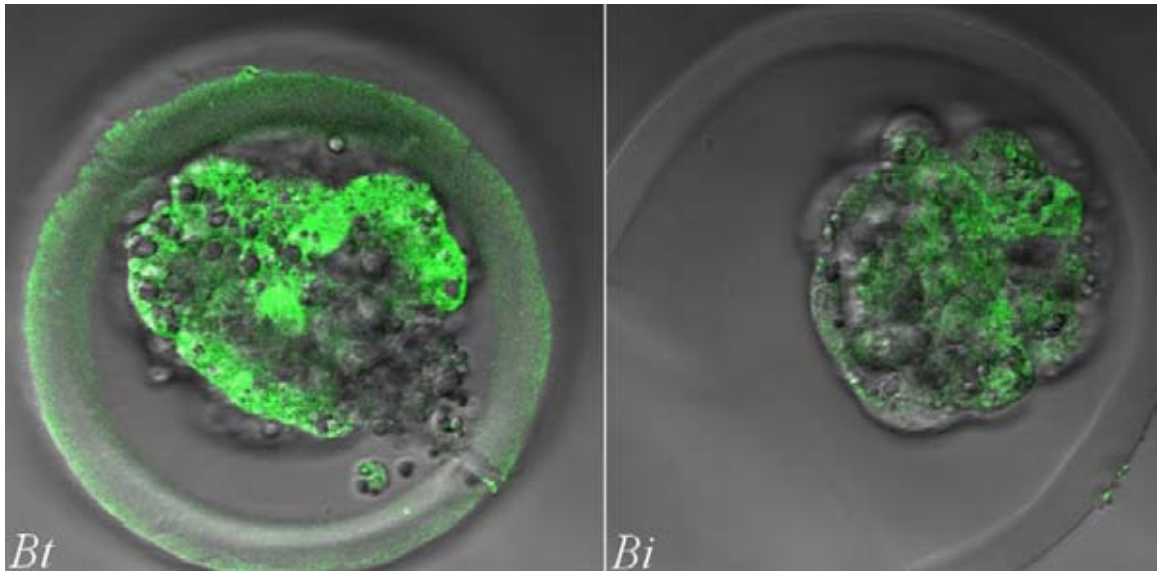


Figura 5.6: Imágenes de fluorescencia de embriones controles positivos, clasificados de buena calidad. Izquierda *Bos taurus*, derecha *Bos indicus*.

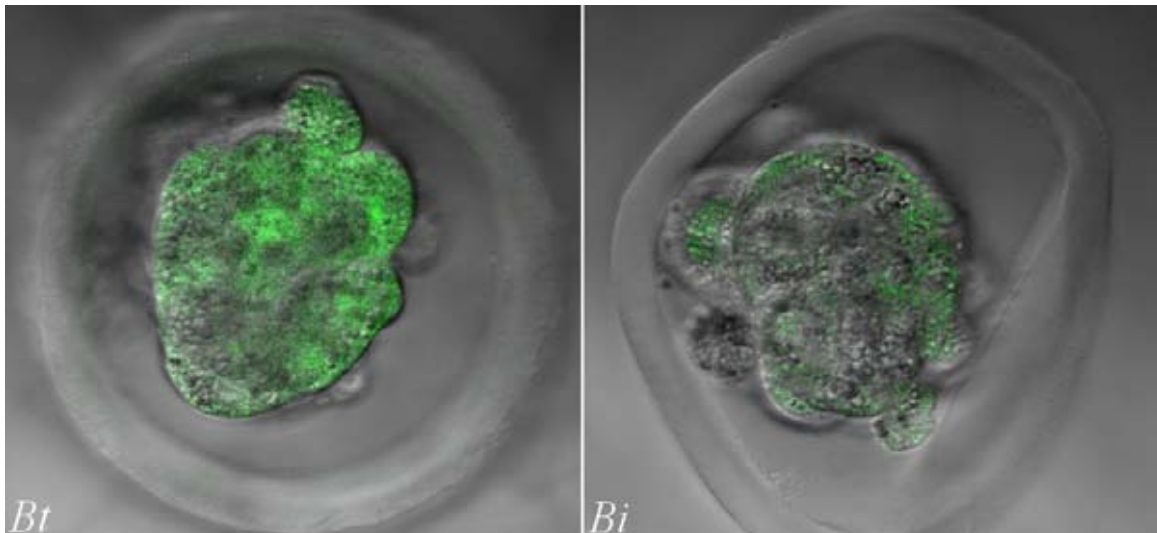


Figura 5.7: Imágenes de fluorescencia de embriones encubados con LAA, clasificados de buena calidad. Izquierda *Bos taurus*, derecha *Bos indicus*.

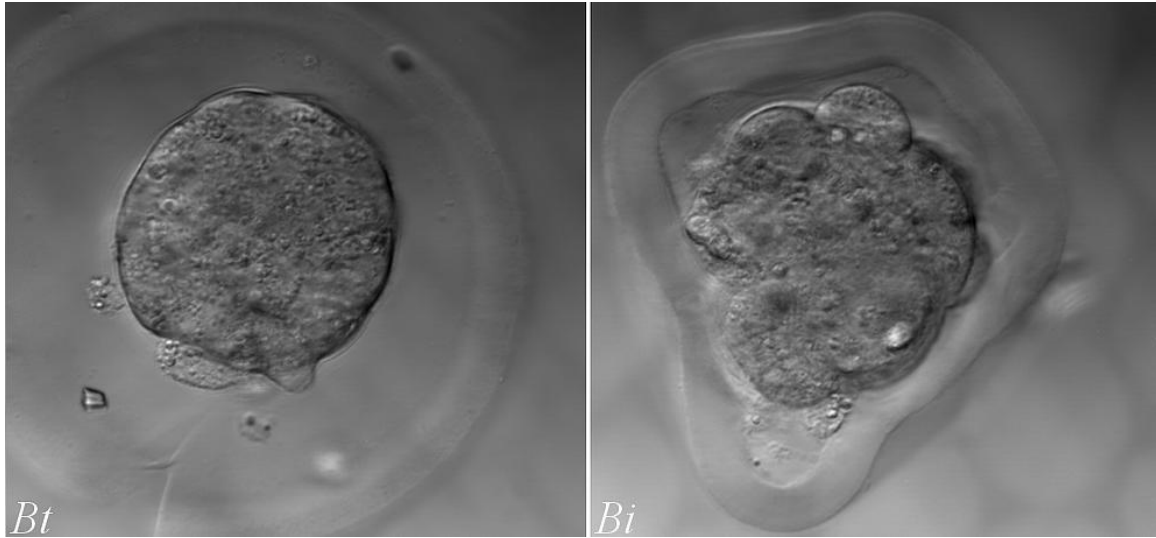


Figura 5.8: Imágenes de fluorescencia de embriones controles negativos, clasificados de buena calidad. Izquierda *Bos taurus*, derecha *Bos indicus*.

### **Análisis de la Intensidad de fluorescencia**

Se encontraron diferencias en la intensidad de fluorescencia (medida indirecta de la cantidad de peroxidación lipídica) entre los embriones de diferente calidad, así como en la comparación entre los embriones de ambas especies. En la figura 5.9 se observan los embriones controles positivos, en los que a pesar de inducir la peroxidación lipídica con hidroperóxido de cumeno, también se observaron diferencias. Entre calidades de los embriones Bt hubo una intensidad de fluorescencia 36 veces mayor en los embriones de calidad 2, y en embriones Bi casi 5 veces mayor en los de calidad 2. Comparando los embriones de ambas especies podemos observar que en los embriones calidad 1, los Bi muestran una intensidad de fluorescencia 17 veces mayor que los Bt, mientras que en los



embriones calidad 2, los embriones Bt tienen una intensidad de fluorescencia 2 veces menor.

En la figura 5.10 se observan los embriones experimentales y se muestra que la diferencia de intensidad de fluorescencia entre embriones de diferente calidad es aproximadamente 31 veces mayor en calidad 2 de Bt y 16 veces mayor en calidad 2 de Bi. Entre los embriones de diferentes especies, podemos observar que para Bi es casi 3 veces mayor que para Bt en embriones de calidad 2 y 5 veces mayor en calidad 1.

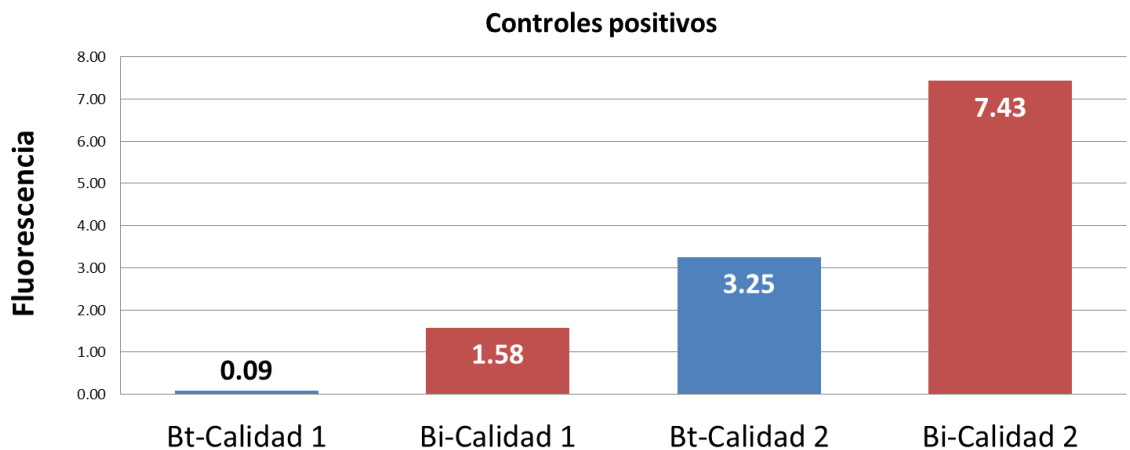


Figura 5.9. Promedio de intensidad de fluorescencia normalizada al volumen de la masa embrionaria en embriones Bt (azul) y Bi (rojo), calidad 1 y 2 controles positivos.

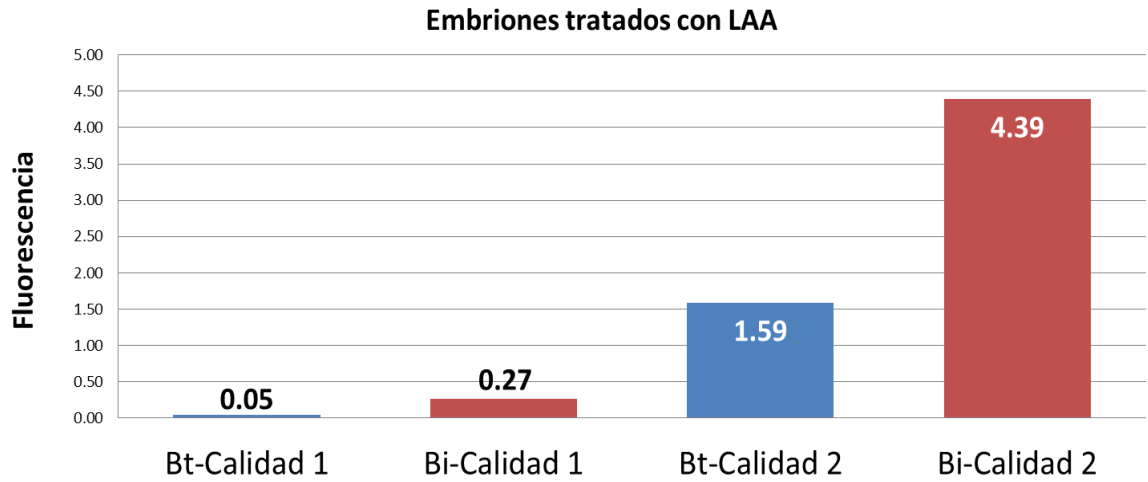


Figura: 5.10. Promedio de intensidad de fluorescencia normalizada al volumen de la masa embrionaria en embriones Bt (azul) y Bi (rojo), calidad 1 y 2 experimentales.

## Discusión

El objetivo de la presente tesis fue estandarizar una técnica para medir peroxidación lipídica en embriones de bovinos del tipo *Bos taurus* y *Bos indicus*, debido a que se han observado diferencias en la manera en que los embriones de Bt y Bi resisten el proceso de congelación y su posterior transferencia, resultando en un menor porcentaje de éxito gestacional en la especie Bi (Barati et al., 2007; Rao et al., 2009; Rao et al., 2010; Alarcón et al., 2010), lo que ha ocasionado una limitada aplicación de la técnica de TE en los trópicos (sitio geográfico donde habitan la mayoría de los animales Bi).

Se ha sugerido que la morfología de las células embrionarias en la especie Bi puede ser una de las causas de la menor tasa de éxito de la TE para esta especie. En resultados previos de laboratorio (Lopez Damian et al. 2012) se han encontrado diferencias en la cantidad de gotas lipídicas en los embriones Bi comparados con los Bt y se propuso que esta peculiaridad podría ser la causa de una pobre recuperación de los embriones después del proceso de descongelación y provocar un mayor grado de peroxidación lipídica dentro de las células embrionarias. Es por ello que la estandarización de una técnica que pudiera medir este fenómeno es importante, para que de esta forma se pueda abordar el problema de si el grado de peroxidación lipídica es diferente en las dos especies y, si este proceso pudiera ser reversible al aplicar otras técnicas como la utilización de antioxidantes.

La técnica para medir la peroxidación lipídica basada en el kit Click-iT® con Alquino de Linoleamida (LAA) ha sido escasamente utilizada en embriones de cualquier especie, por lo que fue necesario realizar el experimento en diferentes ocasiones para obtener resultados confiables. En las primeras fases, al no utilizar el alquino de linoleamida, se encontró que, sin este, el kit era incapaz de detectar la peroxidación lipídica de los embriones bovinos, posiblemente debido al escaso ácido linoleico que estos contienen. En efecto, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Sata et al. (1999), quienes encontraron que los embriones bovinos tienen muy bajas concentraciones de dicho ácido, e incluso, en etapas anteriores a la de blastocisto es imposible detectarlo. Lo anterior podría explicar el hecho de que al utilizar embriones en fase de mórula y tener un kit que muestra los cambios por la peroxidación lipídica en el ácido linoleico, fuera necesario añadir alquino de linoleamida (LAA) y con ello poder detectar la presencia de sustancias como las especies reactivas de oxígeno (ERO) capaces de provocar estrés oxidativo dentro del embrión y, a su vez, la capacidad del embrión de detener este proceso por medio de antioxidantes endógenos.

Debido a lo limitado de la muestra para probar el kit, no se puede excluir la posibilidad de que algunos embriones estén mal clasificados y, por ende, reaccionen de diferente manera al proceso de congelación. Existe evidencia en la literatura que señala que hasta un 20% de los embriones son clasificados erróneamente (Contreras et al, 2008). Es importante recordar que la evaluación de embriones es solamente realizada cuando son colectados, una vez clasificados de acuerdo a criterios previamente establecidos (Stringfellow y Seidel, 1998) los

embriones generalmente no vuelven a ser valorados. Por esta razón, Contreras et al. (2008) propusieron la utilización de un medio de cultivo para verificar la viabilidad de los embriones una vez descongelados y encontraron que los embriones de calidad buena y regular no tuvieron cambios perjudiciales mayores incluso después de 7 horas de incubación, en cambio, los embriones clasificados como de mala calidad tuvieron cambios importantes antes de 2 horas de incubación. También, existen métodos de diagnóstico por tinciones que permiten conocer si los embriones son realmente viables, Ivan et al. (2011) utilizaron Azul de tripán y Rojo neutro para detectar la viabilidad de las células, así como Diacetato de fluoresceína que permite diferenciar los embriones en base a la capacidad que las células viables tienen de absorber y metabolizar la fluoresceína y la Bromodesoxiuridina que penetra en la membrana de los embriones muertos por no tener actividad enzimática. Así mismo, la tinción Azul brillante de cresilo ha sido ampliamente utilizada por su capacidad de medir la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH); que es un componente del ciclo pentosa fosfato e interviene en la formación de ácidos grasos (Bhojwani et al., 2006).

La utilización de la TE empleando protocolos basados en hormonas resulta en un costo muy elevado, aproximadamente el 50% de los costos por embrión transferible son atribuidos a los tratamientos hormonales (Bo y Mapletoft 2014). Por ello técnicas como la producción de embriones *in vitro* han tomado un papel muy importante en la industria de la producción de embriones. Sin embargo, existen estudios que sugieren que el éxito de esta técnica necesita ser evaluado

ya que hay evidencia de que la peroxidación lipídica se ha visto incrementada en células producidas *in vitro* (McCallum et al., 2013). Estos investigadores observaron que los fibroblastos producidos por este medio tienen mayor peroxidación lipídica comparados con los *in vivo*. En el caso de los embriones en un estudio publicado por Komatsu et al. (2014), se encontraron similares resultados en embriones de ratón, donde los producidos *in vitro* tenían un mayor grado de peroxidación lipídica. Lo anterior sugiere que posiblemente durante la producción de embriones *in vitro* ocurra un mayor daño celular que: 1) aumente la peroxidación lipídica y 2) haya un mayor daño debido a oxidación de las células. Esta hipótesis necesita ser verificada, ya que el mismo principio aplicaría para otras biotecnologías como son el sexado de embriones, así como la producción de embriones transgénicos (Hasler et al., 2003), sobre todo porque en la industria de la transferencia de embriones, particularmente en bovinos, se ha observado la tendencia de acelerar la investigación en la producción de embriones *in vitro* con el fin de reducir los costos de producir embriones *in vivo* (Mapletoft, 2013). En efecto, Alarcon et al. (2010) trabajando en condiciones tropicales demostraron que el costo de una hembra de reemplazo fue cercano a los 3000 dólares cuando era producida por TE, lo cual indica un costo mucho mayor que el de una hembra de reemplazo producida por métodos convencionales cuyo costo se estima alrededor de 900 dólares.

Otro problema observado es que la congelación de embriones reduce la viabilidad de las células en aproximadamente un 10% (Hasler, 2001), por lo que es muy importante encontrar mecanismos que puedan hacer que estos procesos sean

reversibles de alguna manera, como podría ser el uso de antioxidantes para desacelerar el daño celular producido por las gotas lipídicas presentes en el embrión. Sin embargo, antes de decidir aplicar algún tipo de tratamiento es necesario verificar si, efectivamente, estos eventos ocurren de la manera que se está proponiendo. Por tal motivo, es relevante contar con medios de diagnóstico que permitan tomar medidas en futuras investigaciones de la factibilidad de intervenciones.

En conclusión, el kit Click-iT<sup>®</sup> para la detección de la peroxidación lipídica con LAA es suficientemente robusto para considerar que puede ser aplicado en estudios posteriores en embriones bovinos. Sin embargo, es necesario remarcar que, es importante aumentar el tamaño de la muestra con el objetivo en mente de comparar la capacidad de soportar el proceso de descongelación en embriones bovinos. A su vez es necesario enfatizar que al menos, durante el desarrollo embrionario en las etapas previas a blastocisto, es importante proporcionar una fuente externa de ácido linoleico para la utilización de este kit y, de esta forma, poder precipitar una reacción que dependiendo de los componentes del embrión, nos permita detectar la capacidad de éste para desencadenar o amortiguar la peroxidación lipídica.

**Referencias:**

Alarcón, M.A.; Galina, C.S.; Corro, M.D.; Asprón, M.A. (2010) Embryo transfer, a useful technique to be applied in small community farms?. *Tropical Animal Health and Production*, 42, 1135-1141.

Ayala, A.; Parrado, J.; Bougria, M.; Machado, A. (1996) Effect of oxidative stress produced by cumene hydroperoxide on the various steps of protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 38, 23105-23110.

Barati, F.; Niasari-Naslaji, A.; Bolourchi, M.; Razavi, K.; Naghzali, E.; Sarhaddi, F. (2007) Pregnancy rates of frozen embryos recovered during winter and summer in Sistani cows. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 8, 151-154.

Betteridge, K.J. (1981) An historical look at embryo transfer. *Journal of Reproduction and Fertility*, 62, 1-13.

Betteridge, K.J. (2003) A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Animal Reproduction Science*, 79, 203-244.

Bhojwani, S.; Alm, H.; Torner, H.; Kanitz, W.; Poehland, R. (2006) Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer. *Theriogenology*, 67, 341-345.



Bo, G.A.; Mapletoft, R.J. (2014) Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*, 81, 38-48.

Celestinos, M.; Gatica, R. (2002) Vitricación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 34, 157-165.

Contreras, D.A.; Galina, C.S.; Avila, J.G.; Aspron, M.P.; Moreno-Mendoza, N. (2008) A system to evaluate the quality of frozen embryos through short-term culture. *Animal Reproduction Science*, 106, 369-379.

Dianzani, M.; Barrera, G. (2008) Pathology and physiology of lipid peroxidation and its carbonyl products. En: Álvarez S, Evelson P (ed.), *Free Radical Pathophysiology*, Transworld Research Network: Kerala, India, 19-38.

Farin, P.W.; Britt, J.H.; Sahw, D.W.; Slenning, B.D. (1995) Agreement among evaluators of bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Theriogenology*, 44, 339-349.

George, E.; Seidel, J.; Seidel, S.M. (1991) Training manual for embryo transfer in cattle. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italia.

Gupta, M.K.; Uhm, S.J.; Lee, H.T. (2010) Effect of vitricación and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development

of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 93, 2602-2607.

Hasler, J.F. (2001) Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, 56, 1401-1415.

Hasler, J.F. (2003) The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Animal Reproduction Science*, 79, 245-264.

Heape, W. (1890) Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 48, 457-9.

Heape, W. (1897) Further note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 62, 178-83.

Ivan, A.; Păcală, N.; Cean, A.; Carabă, V. (2011) Practical methods to assess mammalian embryo quality-staining test comparative study. *Animal Science and Biotechnologies*, 44 (1).

Kafi, M.; McGowan, M.R. (1997) Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science*, 48, 137-157.

Komatsu, K.; Iwase, A.; Mawatari, M.; Wang, J.; Yamashita, M.; Kikkawa, F. (2014) Mitochondrial membrane potential in 2-cell stage embryos correlates with the success of preimplantation development. *Reproduction*, 147, 627-638.

Levine, R.L. (1983) *The Journal of Biological Chemistry*, 258, 11823-11827.

López-Damián, E.P.; Fiordeliso, T.; Lammoglia, M.A.; Alarcon, M.; Aspron, M.; Galina, C.S. (2012) Characterization of lipid droplets in *Bos indicus* and *Bos Taurus* embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 25, 226.

López-Damián, E.P.; Fiordeliso, T.; Lammoglia, M.A.; Alarcon, M.; Aspron, M.; Galina, C.S. (2013) Characterization of lipid droplets in *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos. 39th IETS Congress, Hannover, Alemania.

McCallum, L.E.; Larrew, T.; Chow, J.; Schulte, J.; Simionescu, D.; Simionescu, A. (2013) Metabolic and structural changes in diabetic cardiomyopathy; in vivo and in vitro models. The Termis-Americas 2013 Annual Conference & Exposition, Atlanta, EUA.

Mapletoft, R.J. (2013) History and perspectives on bovine embryo transfer. *Animal Reproduction*, 10, 168-173.

Marquez-Alvarado, Y.C.; Galina, C.S.; Castilla, B.; Leon, H.; Moreno-Mendoza, N. (2004) Evidence of damage in cryopreserved and fresh bovine embryos using the Tunel technique. *Reproduction in Domestic Animals*, 39, 141-145.

Marquez, Y.C.; Galina, C.S.; Moreno, N.; Ruiz, H.; Ruiz, A.; Merchant, H. (2005) Seasonal effect on zebu embryo quality as determined by their degree of apoptosis and resistance to cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 40, 553-558.

Niemann, H. (1991) Cryopreservation of ova and embryos from livestock: Current status and research needs. *Theriogenology*, 35, 109-124.

Perry, G. (2013) 2012 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. International Embryo Transfer Society.

Rao, M.M.; Umamahesh, Y.; Naidu, K.V.; Rao, K.B. (2009) Direct transfer of *Bos indicus* embryos frozen preserved in ethylene glycol, *Indian Veterinary Journal*, 86, 1027-1029.

Rao, M.M.; Umamahesh, Y.; Rao, K.B. (2010) Effect of breed or embryo source on pregnancy rate of cryopreserved bovine embryos. *Indian Veterinary Journal*, 87, 601-602.

Repetto, M.; Semprine, J.; Boveris, A. (2012) Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. Editado por Catala A. Lipid peroxidation. Ed Intech. Nueva Delhi, India, 1–28.

Rondeau, M.; Guay, P.; Goff, A.K.; Cooke, G.M. (1995) Assessment of embryo potential by visual and metabolic evaluation. *Theriogenology*, 44, 351–366.

Sata, R.; Tsujii, H.; Abe, H.; Yamashita, S.; Hoshi, H. (1999) Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing medium during early embryonic development. *Journal of Reproduction and Development*, 45, 97–103.

Stringfellow, D.A.; Seidel, S.M. (1998) A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures, *Manual of the International Embryo Transfer Society*, International Embryo Transfer Society, Pullman, Washington USA.

Tarin, J.J.; Trounson, A.O. (1993) Effects of stimulation or inhibition of lipid peroxidation on freezing-thawing of mouse embryos. *Biology of Reproduction*, 49, 1362-1368.

Umbaugh, R.E. (1949) Superovulation and ovum transfer in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 10, 295-305.

Watson, P.F. (1999) The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 2000: 60-61:481-482.

Wolfe, J.; Bryant, G. (1999) Freezing, drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology*, 39, 103-129.

Zanenga, C.A. (1993) Freezing on zebu embryos - Development and viability. Abstracts of 5th Brazilian Congress on Animal Reproduction. Belo Horizonte, MG, Brasil.