



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD
ANIMAL

CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA DE LAS GOTAS LIPÍDICAS
Y SU EFECTO EN LA CONGELACIÓN DE EMBRIONES *BOS TAURUS*
Y BOS INDICUS* PRODUCIDOS *IN VIVO

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
PRESENTA

EVA PATRICIA LÓPEZ DAMIÁN

TUTORA: **TATIANA FIORDELISIO COLL**
FACULTAD DE CIENCIAS

COMITÉ TUTOR:
MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA - FMVZ
CARLOS SALVADOR GALINA HIDALGO - FMVZ

CIUDAD UNIVERSITARIA CD. DE MÉXICO

AGOSTO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A mis papas

Alfonso López Casanova

Y

Clementina Patricia Damián Ambriz

***Por abrazarme, sostenerme y no dejarme
caer en los momentos más difíciles del
doctorado.***

Agradecimientos

A uno de los pilares mas importantes, quien me enseñó a vencer dificultades y trabajar en equipo. Mi tutora Tatiana Fiordelisio Coll.

Comité tutor: sus consejos y apoyo durante y fuera de los tutorales; así como sus comentarios para mejorar la tesis me alentaron y ayudaron a la culminación de este trabajo: María de Lourdes Juárez Mosqueda y Carlos Salvador Galina.

Miembros del jurado: Por su tiempo y dedicación a la lectura de este trabajo así como sus opiniones para que mejorara la tesis: Héctor Jiménez Severiano, José A. Medrano Hernández.

Fuente financiadora: Por otorgarme una beca de manutención durante mis estudios, CONACyT. Por el apoyo económico a este trabajo, UNAM-DGAPA-PAPIIT IN211013, IN227216.

Posgrado Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal: a todo el personal por su apoyo en los trámites respectivos.

Taller de óptica avanzada de la Facultad de Ciencias: Por su apoyo en la medición de luz incidente en los embriones, Adrián Aupart Acosta.

Técnicos: Por su apoyo para la toma de imágenes en microscopía electrónica de transmisión, Rodolfo Paredes. Por enseñarme y apoyarme en la adquisición de imágenes en microscopía confocal, José Alfredo Jiménez Medina. Por el prestamo de la plátina térmica para los lavados, Ana Delia Rodríguez Cortez.

Profesores: Por ayudarme en la búsqueda de ganado, y apoyarme en la realización de las colecciones de embriones: Miguel Angel Lammoglia, Marco A. Alarcón Zapata, Ivette Rubio. Por autorizar el préstamo de vacas *B. indicus* en el CEIEGT-UNAM para producir embriones, Héctor Basurto Camberos. Por contactarme con un proveedor para la compra de embriones *Bos taurus* congelados a un bajo costo, Salvador Romo. Por ayudarme en la corrección de estilo del artículo, Diana Cecilia Del Río Valdés.

Ranchos: Por su apoyo y disposición para el prestamo de ganado *Bos indicus* y *Bos taurus* (Tepeyac, Actopan; El Rincon, Querétaro; Huizcuahtla, Puebla, La soledad-UNAM, Veracruz). Por su disposición para apoyar la investigación, vendiendo embriones a un bajo costo El porvenir, Tabasco. Atendido por el Dr. Gustavo Peláez.

Proveedores: Por la donación de consumibles para las colecciones de embriones, Agtech, Inc. Por la donación de semen de ambas subespecies bovinas, Limper Congelaciones Profesionales.

Agradecimientos a Título Personal

Compañeros de laboratorio: Por su paciencia, apoyo, enseñanza, amistad, trabajo en equipo y aventuras: José, Nuria, Mariana, Diana, Julio, Luca, Emanuel, Pao, Daniel, Ita, Coral, Yorgui, Midori, Vic, Ana, Juan.

Amigos de posgrado: Nos alentabamos mutuamente para sobrevivir esta travesía. Ramiro, Luz y Jadiel.

Amigos que conocí en el camino de las colecciones embrionarias: Alejandra y Misael, gracias por su amistad y ayuda en los diferentes lavados en los que coincidimos.

Marco A. Alarcón Zapata, gracias por las mórulas *B. taurus* calidad 1 que me donaste para mi investigación, sé que te dolieron y aún así me apoyaste.

Donadoras: Porque ellas soportaron los eventos más incomodos de ovulacion multiple y colección embrionaria. Y sobre todo a las donadoras que fueron utilizadas de forma intensiva: Samantha (*Bos taurus*), Maquina, Guzerat, Chiquita, Bola (*Bos indicus*).

Trabajos generados de esta tesis

Artículos

1. **Artículo publicado:** López-Damián, EP., Jiménez-Medina, JA., Lammoglia, MA., Pimentel, JA., Agredano-Moreno, LT., Chris, W., Galina, CS., Fiordeliso, T. 2018 Lipid Droplets in Clusters Negatively Affect *Bos indicus* Embryos during Cryopreservation. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 2018; 00:1-9. <https://doi.org/10.1111/ahe.12382>
2. **Artículo en preparación:** López-Damián, EP., Jiménez-Medina, JA., Alarcón, MA., Lammoglia, MA., Hernández, A., Galina, CS., Fiordeliso, T. 2018 Cryopreservation induce higher levels of reactive oxygen species, lipid peroxidation and apoptosis in *Bos indicus* embryos compared with *Bos taurus*

Trabajos en congresos

1. López-Damián, EP., Fiordeliso, T., Lammoglia, MA., Alarcón, M., Aspron, M., Galina, CS. 155 Characterization of lipid droplets in *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos. 2012, *Reproduction, Fertility and Development* 25 (1): 226. **39th International Embryo Transfer Society, Annual Conference**. Del 19-22 Enero 2013 en Hannover, Alemania. <https://doi.org/10.1071/RDv25n1Ab155>
2. López-Damián, EP., Jiménez-Medina, JA., Lammoglia, MA., Pimentel, JA., Galina, CS., Fiordeliso, T. P3-51: The lipid droplets clusters: the difference between *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos En **Fourth World Congress of Reproductive Biology 2017 (WCRB 2017)** 27-29 Septiembre 2017 en el Centro de Convenciones de Okinawa, Japón.

Declaración

La autora da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis este disponible para cualquier intercambio bibliotecario.



Eva Patricia López-Damián

Contenido

Listado de Figuras y Cuadros.....	X
Listado de Abreviaciones y Siglas Usadas.....	XI
Resumen.....	XII
Abstract.....	XIII
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN.....	1
Capítulo 2. REVISION DE LITERATURA	
<u>2.1 Importancia de la ovulación múltiple y transferencia de embriones en el ganado bovino.....</u>	6
<u>2.2 Diferencias entre los embriones <i>Bos indicus</i> y <i>Bos taurus</i> y su repercusión en la viabilidad</u>	
2.2.1 Diferencia en composición de ácidos grasos.....	7
2.2.2 Diferencias ultraestructurales.....	9
2.2.3 Diferencias de expresión génica.....	11
2.2.4 Diferencias en resistencia a la temperatura.....	12
<u>2.3 Viabilidad embrionaria bajo la congelación de curva lenta</u>	
2.3.1 Factores lipídicos de los embriones, que reducen una buena calidad criogénica.	
2.3.1.1 Efecto de cantidad.....	14
2.3.1.2 Efecto de la composición.....	15
2.3.1.3 Efecto del tamaño.....	17
2.3.2 Alteraciones metabólicas y bioquímicas inducidas por la congelación-descongelación: Especies reactivas de oxígeno, peroxidación lipídica y apoptosis.....	17
Hipótesis.....	22
Objetivos.....	23

Capítulo 3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Obtención de embriones *B. indicus* y *B. taurus*

<u>3.1.1 Razas de los embriones trabajados y ubicación geográfica de las donadoras.....</u>	25
<u>3.1.2 Selección y dieta de donadora.....</u>	26
<u>3.1.3 Producción de embriones.....</u>	26
<u>3.1.4 Congelación, descongelación y re-hidratación de embriones.....</u>	27

3.2 Determinación de cantidad, volumen, morfología y composición de las gotas lipídicas

<u>3.2.1 Determinación de cantidad y volumen.....</u>	29
<u>3.2.2 Adquisición y análisis de imágenes para determinar cantidad y volumen.....</u>	29
<u>3.2.3 Determinación de morfología y composición.....</u>	31
<u>3.2.4 Procesamiento de embriones para microscopía electrónica de transmisión.....</u>	31
<u>3.2.5 Análisis de imágenes de morfología y composición de las gotas lipídicas.....</u>	32

3.3 Determinación de especies reactivas de oxígeno, peroxidación y apoptosis

<u>3.3.1 Determinación de especies reactivas de oxígeno.....</u>	33
<u>3.3.2 Determinación de luxes provenientes del microscopio estereoscópico.....</u>	34
<u>3.3.3 Determinación de peroxidación lipídica.....</u>	35
<u>3.3.4 Determinación de apoptosis.....</u>	36

3.4 Adquisición y análisis de imágenes para detectar especies reactivas de oxígeno, peroxidación lipídica y apoptosis

<u>3.4.1 Adquisición de imágenes.....</u>	37
<u>3.4.2 Análisis de imágenes.....</u>	37

<u>3.4.3 Análisis estadístico para cantidad, volumen, morfología, composición, EROs, PL y apoptosis</u>	38
<u>Capítulo 4. RESULTADOS</u>	
<u>4.1 Cantidad y volumen de las GLs</u>	42
<u>4.2 Morfología y composición de las GLs</u>	49
<u>4.3 Especies reactivas de oxígeno</u>	51
<u>4.4 Peroxidación lipídica y número de núcleos positivos a TUNEL</u>	51
<u>4.5 Correlación del volumen y número de grupos de gotas con EROs y PL</u>	52
<u>Capítulo 5. DISCUSIÓN</u>	
<u>5.1 Gotas lipídicas</u>	57
<u>5.2 Especies reactivas de oxígeno, peroxidación lipídica y apoptosis</u>	62
<u>REFERENCIAS</u>	66

Listado de Figuras y Cuadros

Listado de figuras

<u>Figura 1.</u>	Fluorescencia basal de embriones controles negativos.....	40
<u>Figura 2.</u>	Organización y distribución de las GLs en el embrión.....	45
<u>Figura 3.</u>	Comparación de las principales características de organización de los grupos de gotas entre embriones <i>B. indicus</i> y <i>B. taurus</i>	46
<u>Figura 4.</u>	Distribución y comparación de las principales características de organización de los grupos de gotas de embriones C2 <i>B. indicus</i> y <i>B. taurus</i>	47
<u>Figura 5.</u>	Comparación del volumen de las GLs individuales.....	48
<u>Figura 6.</u>	Morfología y composición de las GLs.....	50
<u>Figura 7.</u>	Comparación de niveles de especies reactivas de oxígeno entre embriones <i>B. indicus</i> y <i>B. taurus</i> antes y después de la congelación.....	53
<u>Figura 8.</u>	Comparación de niveles de peroxidación lipídica entre embriones <i>B. indicus</i> y <i>B. taurus</i> antes y después de la congelación.....	54
<u>Figura 9.</u>	Núcleos positivos a la prueba de Túnel entre embriones <i>B. indicus</i> y <i>B. taurus</i> antes y después de la congelación.....	55

Listado de cuadros

<u>Cuadro 1.</u>	Factores de conversión para diferentes longitudes de onda.....	39
------------------	--	----

Abreviaturas y Siglas Usadas

ADNmt	ADN mitocondrial
ATP	Adenosín trifosfato
au	Unidades arbitrarias
auf	Unidades arbitrarias de fluorescencia
C1	Calidad 1
C2	Calidad 2
C3	Calidad 3
Ca ²⁺	Calcio
CD	Congelado-descongelado
CIDR	Dispositivo intravaginal liberador de progesterona
D-PBS	Búfer Fosfato Salino Dulbecco
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FC	Fosfatidilcolina
FSH	Hormona folículo estimulante
GLs	Gotas lipídicas
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GPX4	Glutati3n peroxidasa 4
H ₂ O ₂	Radical per3xido de hidrogeno
HIF	Factor inducible de hipoxia
IETS	Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones
LNMA	Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada
MET	Microscopia electr3nica de transmisi3n
MOET	Ovulaci3n m3ltiple y transferencia de embriones
NS	No significativa
O ₂ ^{•-}	Radical anión super3xido
OH [•]	Radical hidroxilo
OsO ₄	Tetr3xido de osmio
PBS	Búfer Fosfato Salino
PFA:	Paraformaldehído
PGF ₂ α	Prostaglandina
PL	Peroxidaci3n lipídica
PRDX1	Peroxiredoxin 1
PVP	Polivinilpirrolidona
RE	Retículo endoplásmico
ROI	Regi3n de inter3s

Resumen

Los embriones *Bos indicus* producidos *in vivo* obtienen bajos porcentajes de gestación en comparación con los de *Bos taurus* tras su criopreservación por curva lenta (40 vs. 70%). A pesar de que no se conocen las características celulares que generan esta condición, su baja crio-viabilidad está ligada con la alta cantidad de gotas lipídicas (GLs) y estrés oxidativo. Para conocer cómo estos orgánulos podrían afectar la crio-viabilidad de los embriones *B. indicus*, se analizó y comparó la proporción, volumen, morfología y composición de las GLs entre subespecies y condición -- frescos vs. congelados-descongelados -- valorando de la misma forma, las especies reactivas de oxígeno (EROs) y el daño post-criopreservación a través de la peroxidación lipídica (PL) y apoptosis. La primera parte de nuestros resultados (Capítulo 4.1 y 4.2) revelan dos tipos de organización de GLs, en forma individual y en grupos (clústeres); siendo éste último tipo de organización el que sufre los mayores cambios post-criopreservación en ambas subespecies. Mientras los embriones *B. indicus* muestran un reducción de grupos de gotas de 11% a 5% ($P<0.05$) los de *B. taurus* muestran un incremento de 2% a 7% ($P<0.05$), sugiriendo un proceso de fragmentación y coalescencia, respectivamente. Estos efectos post-criopreservación pueden ser confirmados a través de la reducción de volumen de $37 \mu\text{m}^3$ en los grupos de gotas de *B. indicus* y el aumento de $42 \mu\text{m}^3$ en los grupos de gotas de *B. taurus*. La morfología también muestra cambios por el efecto de la congelación-descongelación sugiriendo estos mismos efectos, fragmentación y coalescencia, a través del incremento del número de gotas craqueladas en *B. indicus* (35% vs. 93%, $P<0.05$) pero no en *B. taurus* (33% vs. 37%, NS). La composición que prevalece en las gotas de *B. indicus* es saturada mientras en *B. taurus* insaturada, sin embargo, post-descongelación en ambas subespecies se observa un cambio hacia ácidos grasos insaturados, lo cual probablemente se deba a la PL. En la segunda parte de nuestros resultados (Capítulo 4.3-4.5) los niveles de EROs son superiores en el ganado *B. indicus* tanto antes (14 auf vs. 8 auf, $P<0.05$) como después (21 auf vs. 14 auf, $P<0.05$) de la congelación; correlacionándose positivamente con la alta proporción de gotas en grupo que presentan los *B. indicus*, lo cual a su vez es indicativo de estrés oxidativo. El daño oxidativo post-descongelación que los embriones *B. indicus* experimentan con respecto a *B. taurus* son mayores tanto en peroxidación lipídica (51 auf vs. 12 auf, $P<0.05$) como en apoptosis (11 vs. 6, $P<0.05$). En conclusión, las características morfométricas de las GLs ofrecen importantes diferencias celulares entre subespecies que afectan de manera opuesta a los embriones después del proceso de congelación-descongelación por curva lenta, favoreciendo así, los efectos del estrés oxidativo a través de la peroxidación lipídica y muerte celular.

Palabras clave: Embriones bovinos, Gotas lipídicas, Especies reactivas de oxígeno, Peroxidación lipídica, Apoptosis

Abstract

The *Bos indicus in vivo* embryos have lower pregnancy rates than *Bos taurus* embryos after being cryopreserved by slow freezing (40% vs. 70%). Although, the cellular characteristics that generate this condition are still unknown, their poor freezability is link to a high quantity of lipid droplets (LDs) and oxidative stress. To know how these organelles could affect the *B. indicus* cryosurvival, the LDs proportion, volume, morphology and composition were analysed and compare between subspecies and conditions -- fresh vs. freeze-thawing -- measuring the reactive oxygen species (ROS) and their damage post-cryopreservation through lipid peroxidation (LP) and apoptosis. The first half of our results (Chapter 4.1 y 4.2) revealed two types of LDs organization, such as individual and clusters; being the latter type of organization, the one who experience the major changes post-cryopreservation in both subspecies. Meanwhile, the *B. indicus* clusters show a reduction from 11 to 5 % ($P<0.05$) in *B. taurus* is displayed an increase from 2% to 7% ($P<0.05$), suggesting a fragmentation and coalescence process, respectively. These post-cryopreservation effects, could be confirm through the clusters volume reduction around $37 \mu\text{m}^3$ in *B. indicus* and an augment of $42 \mu\text{m}^3$ in *B. taurus*. The morphology of LDs in *B. indicus* embryos also is impaired by freezing, inferring the fragmentation and coalescence events through the increase of cracked droplets (35% vs. 93%, $P<0.05$), but not in *B. taurus* (33% vs. 37%, *NS*). The composition that prevails in *B. indicus* LDs relies on saturated fatty acids while unsaturated in *B. taurus*. After freeze-thawing process both subspecies displayed unsaturated LDs, which probably is due to LP. The second part of our results (Chapter 4.3-4.5) shows that ROS levels are superior in *B. indicus* embryos in both conditions fresh (14 auf vs. 8 auf, $P<0.05$) and frozen (21 auf vs. 14 auf, $P<0.05$); displaying at the same time, a positive correlation with the high clusters proportion in *B. indicus* embryos, which infer an oxidative stress. The oxidative damage that *B. indicus* embryos experience post-cryopreservation, is higher than *B. taurus* embryos in both types of damages, lipid peroxidation (15 auf vs. 12 auf, $P<0.05$) and apoptosis (11 vs. 6, $P<0.05$). In conclusion, the morphometric characteristics of LDs between subspecies offers insights into important cellular differences between embryos, which are affected in opposite directions after slow freezing, favor the stress oxidative effect through the lipid oxidation and cell death.

Key words: Bovine embryos, Lipid droplets, Reactive oxygen species, Lipid peroxidation, Apoptosis

Introducción

El ganado *Bos indicus* y *Bos taurus* provienen del mismo ancestro común (*Bos primigenius*), sin embargo, evolucionaron en dos momentos de domesticación diferente [1](#). En este proceso, se adaptaron a los diferentes medios en los que habitan produciéndose variaciones de fenotipo, grasa en leche, composición de la canal y rasgos de fertilidad [2,3](#), lo cual impacta la eficiencia productiva de cada subespecie.

Con la finalidad de incrementar la productividad de cada subespecie, diferentes metodologías de reproducción se han utilizado, destacando entre ellas la transferencia de embriones [4](#). Esta biotecnología además de permitir el incremento de la cantidad de descendientes que una hembra puede tener al año y de reducir los intervalos generacionales, brinda la facilidad de manipular los embriones o la selección de cruza y con ello el mejoramiento genético a través de la importación o exportación de embriones congelados [5](#). Para realizar la transferencia de embriones se requiere de la inducción de ovulación múltiple de una vaca donadora, cuyas características productivas son deseables. Después de la fertilización de los óvulos, el proceso culmina con la extracción de los embriones alrededor del día 7 (después del estro) para después ser transferidos en fresco a vacas receptoras o congelados para su posterior uso [6](#).

El éxito de sobrevivencia de los embriones congelados depende de muchos factores pero particularmente de la calidad embrionaria. Esto se determinó mediante un estudio de varios años en diferentes localidades con ganado *Bos taurus*, donde se pudo determinar que, los embriones clasificados como calidad 1 (C1, buenos) tanto en fresco como congelados obtienen mayores tasas de gestación (73, 63%, respectivamente) que embriones calidad 2 (C2, regulares) (56, 44%) y calidad 3 (C3, malos) (48, 36%) [7](#). En contraste, cuando los embriones provienen de madre *B. indicus* los resultados de preñez son inferiores (37-41%) a los reportados en *B. taurus* (60 a 72%) [7-12](#). Estos resultados sugieren que el origen materno influye sobre la calidad embrionaria.

En estudios realizados en nuestro grupo de trabajo, se analizó la calidad de los embriones de ambas subespecies a nivel ultraestructural, tomando como referencia la evaluación morfológica de rutina que se realiza empleando microscopia estereoscópica. Encontrando, que el 5% de los embriones *B. indicus* clasificados como C1, en realidad, corresponden a C2 y el 22% a C3 [13](#). Por el contrario, los embriones *B. taurus* clasificados como C1 aumentan en 14% cuando estos en un inicio eran considerados C2 [14](#). Estos resultados señalan que los embriones *B. indicus* a pesar de ser clasificados morfológicamente como C1 tienen características ultraestructurales que denotan una menor calidad.

López-Damián y colaboradores [14](#) proponen que una de las causas de la baja calidad embrionaria se debe a la alta proporción de gotas lipídicas (GLs). La elevada presencia de GLs, ha sido caracterizada como un factor que resta calidad ultraestructural [15](#) promueve bajos porcentajes de gestación [16](#) y baja crio-tolerancia [17](#). Así, por ejemplo, cuando embriones de alto contenido lipídico como los porcinos son delipidados (remoción de GLs) la viabilidad embrionaria post-descongelación incrementa [18](#), dejando en claro que las GLs intervienen negativamente sobre la crio-viabilidad.

Además de la cantidad de GLs, el tamaño y composición también influyen sobre la viabilidad post-descongelación [19,20](#). Li [19](#) y Nakaya [21](#) mostraron en embriones bovinos producidos *in vitro* que cuando el tamaño de la gota lipídica es pequeño (2.5µm de diámetro) los porcentajes de sobrevivencia aumentan (78.5%) porque se produce una baja cantidad de hidroperóxidos en comparación a cuando una gota es grande (6.3 µm, 46.4% de sobrevivencia). En relación a la composición, la presencia de ácidos grasos saturados además de generar mayor sensibilidad al enfriamiento [20,22,23](#) promueve altos niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs) [24](#) y apoptosis [25-28](#). Estas observaciones indican que las diferentes características de las GLs influyen sobre la crio-viabilidad embrionaria.

Tomando en cuenta que la cantidad, tamaño y composición de las GLs están correlacionadas con los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs)²⁹, peroxidación lipídica (PL) ²¹ y porcentaje de apoptosis ³⁰ creemos que el efecto de la congelación y descongelación, es decir, un efecto de hipoxia y re-oxigenación, incrementará las EROs dañando a las células a nivel de lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, suscitando eventos de PL y apoptosis que culminarán en una disminución de la viabilidad celular, perdiendo así el embrión la competencia de implantación. Por lo que si las GLs de los embriones *B. indicus* tuvieran alguna de las características negativas señaladas anteriormente, podríamos inferir cuales son las causas de una mala congelación y por lo tanto bajos porcentajes de gestación después de un proceso de criopreservación. El objetivo del presente proyecto es caracterizar y comparar la cantidad, volumen, morfología y composición de las GLs; así como los niveles de EROs, PL y apoptosis de los embriones de *B. indicus* y *B. taurus* producidos *in vivo* antes y después de la congelación de curva lenta.

**Revisión de
Literatura**

2.1 Importancia de la ovulación múltiple y transferencia de embriones en el ganado bovino.

La ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET, por sus siglas en Inglés) es una técnica biotecnológica que ha permitido mejorar el genotipo de la población de un hato [31](#), incrementar el número de descendientes de una hembra al año, reducir intervalos generacionales y salvaguardar material genético de animales que padecen enfermedades como encefalitis espongiforme bovina, lengua azul, *Brucella abortus*, leucosis enzootica bovina, fiebre aftosa y rinotraqueitis infecciosa bovina [32](#). Todas estas ventajas han impulsado a MOET como la herramienta más viable de producción y mejoramiento genético.

La preferencia por el uso de esta biotecnología incrementó con el surgimiento de la criopreservación, lo cual favorece el almacenamiento de embriones por tiempo indefinido y su transferencia a cualquier parte del mundo, evitando los inconvenientes que el transporte de semovientes tiene [5.33.34](#). De esta manera, MOET se posicionó como la biotecnología de embriones congelados de mayor uso a nivel mundial [6.31.35](#), logrando altas tasas de gestación (entre 54-70%) en la mayor parte del ganado donde se ha empleado [7.36.37](#).

A pesar de que los porcentajes de gestación son afectados por diferentes factores, como la edad de la receptora, método de transferencia, estación del año, volumen de la pajilla, lugar de depósito del embrión o si son frescos o congelados, es la calidad embrionaria la que sin duda representa el principal factor que repercute sobre las tasas de preñez [7](#). El éxito de los porcentajes de gestación son significativamente superiores (62%) con embriones C1 mientras que la transferencia de embriones C3 alcanzan hasta un 36% [7.38](#).

No obstante, respecto a los rangos de concepción, se ha identificado que no todo tipo de ganado obtiene altas tasas de gestación con el uso de embriones C1, es decir, los embriones provenientes de ganado *B. indicus* conciben porcentajes bajos de gestación entre 16 y 41% mientras que los *B. taurus* de entre 54 y 70% [8-12](#). Una posible explicación a estas diferencias entre subespecies, es que los embriones de la primera son de menor calidad que los *B. taurus* y por eso se observan los bajos índices de gestación.

Estudios de nuestro grupo de trabajo mostraron que efectivamente los embriones *B. indicus* son de menor calidad. Para ello, embriones clasificados morfológicamente en calidades C1, C2 y C3 fueron evaluados a nivel ultraestructural. Encontramos que el 5% de los embriones *B. indicus* clasificados como C1 corresponden en realidad a C2 y el 22% a C3 [13](#). Por el contrario 14% de los embriones clasificados como C2 en *B. taurus* en realidad eran C1 [14](#). Estos resultados señalan que a pesar de tener características morfológicas de embriones C1 los componentes ultraestructurales de los embriones *B. indicus* denotan una menor calidad, lo cual repercute en el éxito de la criopreservación de este tipo de ganado.

2.2 Diferencias entre los embriones *Bos indicus* y *Bos taurus* y su repercusión en la viabilidad

2.2.1 Diferencias en composición de ácidos grasos

Los embriones *B. indicus* y *B. taurus* difieren en características de composición de ácidos grasos, ultraestructura, expresión génica y resistencia a la temperatura. En condiciones normales estas características potencializan su viabilidad, pero pueden disminuirla en escenarios estresantes como con el estrés calórico en embriones *B. taurus* [39-42](#) o la congelación en los embriones *B. indicus* [12,43](#).

Dentro de estas características celulares la composición de los lípidos es una particularidad que difiere entre especies. McEvoy y colaboradores [44](#) estudiaron la composición de los ácidos grasos en ovocitos de tres especies diferentes (cerdo, bovino y ovino), encontrando de los 24 ácidos grasos presentes, que los ácidos palmítico (16:0), oleico (18:1 Δ^9), esteárico (18:0) y linoleico (18:2 $\Delta^{9,12}$) son los más abundantes en las tres especies. Dentro de esos ácidos se destaca por su abundancia el ácido palmítico (cerdo 35%, bovino 32% y ovino 25%), seguido por el oleico (cerdo 22%, bovino 25% y ovino 26%), esteárico (4-16% en las tres especies) y linoleico (5-8%).

También existen algunas disimilitudes entre las subespecies *B. indicus* y *B. taurus*. Sudano y colaboradores [45](#) al analizar la diferencia de fosfolípidos entre ambos biotipos embrionarios, encontraron que el ácido palmítico (16:0) y esteárico (18:0) predominan en los embriones *B. indicus* mientras que en los *B. taurus* el linoleico (18:2 $\Delta^{9,12}$). Se podría entonces pensar que los embriones con menor resistencia a la congelación (*Sus scrofa domesticus* y *B. indicus*) están compuestos predominantemente de ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico), mientras que embriones (*Ovis orientalis* y *B. taurus*) menos susceptibles a condiciones de hipotermia [12.46.47](#) revelan una composición de ácidos grasos insaturados [22.24.27.28.48](#).

Diversos estudios señalan que los ácidos grasos saturados, en especial el palmítico, tienen efectos detrimentales sobre múltiples tipos celulares – ovocitos, fibroblastos, mioblastos, células β , hepatocitos – [22.24.27.28.48](#). Aunado a esto, en ovocitos bovinos *in vitro* se ha observado que el ácido palmítico disminuye la maduración, fertilización, división y desarrollo embrionario [22](#) mientras los ácidos insaturados mejoran la fertilidad [49](#) e incrementan la crio-viabilidad a través de la resistencia al enfriamiento [20.22.23.25.50](#).

Se ha observado que la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados cambia en diversos organismos según el clima [23.51](#). Por ejemplo, en verano, los ovocitos bovinos exhiben una mayor cantidad de ácidos grasos saturados (16:0 y 18:0) que en invierno, cuando predominan los insaturados (18:2 - 22:6) [52](#). Los cambios de composición están vinculados a la temperatura ambiental debido a que de ella depende el punto de fusión de los lípidos; es decir que la temperatura ambiental es la que mantiene a los lípidos en fase líquida [51](#).

El punto de fusión de los ácidos grasos está inversamente relacionado con su número de ligaduras (a mayor número de ligaduras su punto de fusión será a una temperatura menor). Por ello los ácidos grasos saturados tienen sus puntos de fusión a altas temperaturas (oleico (18:1) alrededor 15°C) en comparación con los insaturados (linoleico (18:2) a -5°C; linolénico (18:3) a -11°C). Dado que el ganado *B. indicus* habita en climas tropicales donde la temperatura oscila entre 23 y 41°C es de inferir que la composición de sus fosfolípidos sea de ácidos grasos saturados.

2.2.2 Diferencias ultraestructurales

Una de las estrategias celulares para reducir la lipotoxicidad generada por los ácidos grasos saturados [24.26-28.48](#) es la formación de numerosas GLs [53.54](#) cuya función es almacenar los ácidos grasos polinsaturados, evitando que sean oxidados por radicales libres [55](#).

Bajo este supuesto, y tomando en cuenta la composición lipídica de los embriones *B. indicus*, se esperaría que éstos tengan una mayor cantidad de GLs que los *B. taurus*. Estudios realizados tanto en ovocitos [56](#) como en embriones [57](#) *B. indicus* y *B. taurus* – empleando diferentes métodos de valoración (densidad de flotación, microscopía epifluorescente y microscopía electrónica de transmisión (MET)) – encontraron que los embriones de la primera subespecie poseen una mayor cantidad de GLs que los de la segunda. Sin embargo, otros autores que también utilizaron técnicas

ultraestructurales [58](#) y de coloración de lípidos por medio de Sudan negro concluyeron lo contrario [45](#). Para esclarecer este dato es necesario la realización de un estudio mucho más detallado debido a que todas estas técnicas presentan limitantes ópticas.

Otra diferencia ultraestructural entre embriones *B. indicus* y *B. taurus* es la abundancia en mitocondrias, la cual es mayor tanto en ovocitos [59](#) como en embriones *B. indicus* [58](#). Si bien la cantidad de las mitocondrias es una característica intrínseca de cada subespecie, su alta proporción sugeriría que este tipo de embriones requieren altas concentraciones de energía. Sin embargo, la mayoría de las mitocondrias en los ovocitos *B. indicus* son redondas (inmaduras) lo que denota una baja actividad mitocondrial [59](#). Conforme el desarrollo embrionario progresa, las mitocondrias pasan de ser redondas, densas e inactivas a alargadas, translúcidas y activas, manteniéndose, a pesar de ello, cierta proporción de mitocondrias inmaduras [58,60](#). Estos datos sugieren un incremento en el metabolismo embrionario durante la maduración del embrión, pero sigue siendo bajo en *B. indicus* comparado con *B. taurus*.

Por lo tanto, al poseer *B. indicus* una mayor cantidad de mitocondrias se podría pensar que este biotipo embrionario requiere de altas concentraciones de ATP para su desarrollo pero, en contraste, su morfología refleja un bajo grado de actividad mitocondrial. Esto permite hipotetizar que los embriones *B. indicus*, en la etapa de mórulas y blastocistos, modulan su actividad mitocondrial para cuando el desafío energético es necesario, como por ejemplo en la pre-implantación, gastrulación y crecimiento fetal [61](#).

Uno de los indicadores clave de la actividad metabólica dentro de los embriones es el consumo de oxígeno [62](#). Al ser comparados los cultivos de piel, corazón e hígado de fetos *B. indicus* con los de *B. taurus*, los primeros mostraron un alto consumo de oxígeno (11.6 vs. 19.8%) [63](#), evidenciándose así que la actividad metabólica en

embriones *B. indicus* es mayor. Esto muy probablemente se deba a las mutaciones del ADN mitocondrial (ADNmt) [63](#).

En estudios donde el objetivo era estimar la divergencia que existe entre el ganado *B. indicus* y *B. taurus* descubrieron que el ADNmt difiere en 237 posiciones de nucleótidos entre subespecies, las cuales afectan los complejos I, III, IV y V de la fosforilación oxidativa [2.3.63](#). Como estos complejos están involucrados en el transporte de electrones, no solo influyen sobre la producción de ATP sino que también intervienen en la generación de EROs [64](#).

Por lo tanto, además de su principal función como productora de energía, la mitocondria también contribuye al estado REDOX, el envejecimiento y el control de la apoptosis [61.65](#). Debido a todo esto, las mutaciones del ADNmt entre el ganado *B. indicus* y *B. taurus* pueden ser el origen de las diferencias de expresión génica entre ambas subespecies.

2.2.3 Diferencias de expresión génica

Estudios comparativos sobre la expresión génica de *B. indicus* vs. *B. taurus*, han demostrado que los embriones de origen taurino activan genes para prevenir la apoptosis (DAD1), promover la elongación de ácidos grasos insaturados (AUH, ELOVL6) y expresar actividad mitocondrial (ATP5B) durante el desarrollo embrionario [66](#). Por su parte, los embriones *B. indicus* sobre-expresan los genes involucrados con la reducción del estrés oxidativo (GPX4 y PRDX1) [66.67](#).

Estas diferencias en expresión de genes se asocian perfectamente con las diferencias descritas anteriormente (Capítulo 2.2.1 y 2.2.2); por ejemplo, en *B. taurus* se relacionan con composición y morfología mitocondrial y en *B. indicus* con el consumo de oxígeno. Los genes AUH y ELOVL6 están relacionados con el metabolismo lipídico en general y en particular con la elongación de ácidos grasos insaturados, lo cual coincide con el reporte de Sudano y colaboradores [45](#) en donde señalan que *B. taurus*

contiene principalmente ácidos grasos insaturados de cadena larga, en comparación con *B. indicus* (compuesto de ácidos grasos saturados y cadena corta).

Por otra parte, el gen ATP5B se vincula con el transporte de protones y la generación de ATP durante la fosforilación oxidativa. Este gen, con mayor expresión en *B. taurus*, indica una alta actividad mitocondrial *versus B. indicus*, lo cual coincide con la proporción morfológica de mitocondrias maduras en ambas subespecies.

Por último, la sobreexpresión de los genes involucrados en la regulación del estrés oxidativo – GPX4 y PRDX1 – se vincula con el consumo de oxígeno, ya que aproximadamente el 2% del oxígeno consumido se diversifica a la formación de EROs [64,68](#), lo cual haría que al consumir *B. indicus* 1.7 veces más oxígeno que *B. taurus* [63](#) la producción de EROs sería mayor en la primera subespecie.

La expresión de los genes glutatión peroxidasa (GPX4) y peroxirredoxina (PRDX1) mantienen activa la producción de estas enzimas antioxidantes, que en conjunto con superóxido dismutasa (SOD) y catalasa son catalogadas como “la primera línea de defensa antioxidante” degradando al anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) [69](#). Se ha reportado que la supresión de GPX4 en el desarrollo embrionario es letal [69](#). El hecho de que *B. indicus* mantenga activa la expresión de éste gen es un indicador de que este tipo de embriones mantienen altas concentraciones antioxidantes posiblemente debido a altas tasas de EROs.

2.2.4 Diferencias en resistencia a la temperatura

Una última diferencia embrionaria entre *B. indicus* y *B. taurus* es la resistencia a altas (41°C) y bajas (-6°C) temperaturas. Diversos estudios han demostrado que tanto ovocitos como embriones *B. taurus* expuestos a altas temperaturas – hasta 41 °C – alteran su funcionamiento celular, disminuyendo sus tasas de desarrollo y, por ende, de gestación. En cambio los de *B. indicus* no muestran ninguna modificación [70,71](#) a

menos que sean expuestos a temperaturas por debajo los cero grados centígrados (como sucede en la congelación).

Así, los embriones *B. taurus* en condiciones de hipertermia sufren de desorganización de los microtúbulos, reducción de la actividad mitocondrial, incremento de ácidos grasos saturados, translocación de la fosfatidilserina en la membrana plasmática e incremento de blastómeros apoptóticos [41.71](#). En cambio, los embriones *B. indicus* no están adaptados a entornos de hipotermia exhibiendo muerte, lisis, hinchamiento celular, vacuolización mitocondrial y daños en microvellosidades, retículo endoplásmico (RE) y aparato de Golgi [58](#) reduciendo su viabilidad [66](#).

La pérdida de la viabilidad conlleva a una caída marcada en los porcentajes de preñez. Cuando los embriones *B. taurus* están bajo circunstancias de estrés calórico sus índices de gestación se reducen de 59 a 27% [41.42](#), y cuando los embriones *B. indicus* se encuentran en condiciones de congelación el porcentaje baja de 53 a 26% [9.72](#). Estos resultados muestran el efecto negativo de la temperatura sobre cada biotipo embrionario, los cuales están adaptados a diferentes condiciones ambientales.

A pesar de que las subespecies *B. indicus* y *B. taurus* provienen del mismo ancestro común - *Bos primigenius* - su evolución se dio en climas diferentes, dando lugar a mutaciones en el ADNmt [3](#); ya que las mitocondrias son una herencia 100% materna [73](#) se les responsabiliza por la calidad y termotolerancia de los embriones [70.74](#).

Al ser los embriones de ambas subespecies diferentes es necesario estudiar el agente causal que no permite una buena recuperación post-congelación de los embriones *B. indicus* para poder proponer estrategias que incrementen sus porcentajes de gestación bajo efectos de congelación.

2.3 Viabilidad embrionaria bajo la congelación de curva lenta

2.3.1 Factores lipídicos de los embriones que reducen una buena calidad criogénica

2.3.1.1 Efecto de la cantidad

A pesar de los beneficios de la criopreservación, no todas las células sobreviven a la congelación de curva lenta. Específicamente hay dos procesos que afectan la viabilidad celular, el primero es el estrés osmótico [75](#) generado por el desacople de las actividades metabólicas y de membrana durante la disminución de la temperatura [76,77](#); y el segundo es la congelación intracelular desencadenada por el daño de la membrana [75](#). Idealmente, la congelación intracelular no debe ocurrir hasta que las células se hayan deshidratado y ya no existan más cambios de volumen, lo cual ocurre entre los -30°C y -45°C [78](#); sin embargo, si esto ocurriera antes, la formación intracelular de cristales de hielo romperían mecánicamente las células incrementando los índices de muerte celular y por tanto pérdida de la viabilidad embrionaria.

Visintin y colaboradores [58](#) al comparar alteraciones ultraestructurales entre los embriones *B. indicus* y *B. taurus* tras una congelación de curva lenta encontraron que ambos biotipos expresan la misma baja proporción de daños a nivel de RE, aparato de Golgi, vacuolización mitocondrial y microvellosidades, pero una diferencia significativamente alta de lisis, hinchamiento y muerte celular en los embriones *B. indicus*. Estas últimas características también han sido observadas en embriones de alto contenido lipídico, como son los porcinos [46](#).

Los embriones porcinos tienen la particularidad de no resistir el proceso de congelación-descongelación, lo cual ha sido atribuido a la gran cantidad de GLs que presentan. Esta relación se encontró a través de estudios donde la remoción de los lípidos (delipidación) antes de la congelación aumenta la sobrevivencia de 0 a 64% [46](#). Esta misma analogía ha sido observada en embriones bovinos *in vitro* cultivados con suero y sin suero donde los primeros se caracterizan por tener un alto contenido

lipídico *versus* los segundos y al mismo tiempo menores porcentajes de eclosión (36 vs. 57 %) [17](#). Aunado a esto, en embriones bovinos *in vivo* se ha demostrado que los porcentajes de gestación post-descongelación de embriones oscuros (alto contenido lipídico) son inferiores a los de tonalidad clara (bajo contenido de GLs) – 27 vs. 51 % – [16](#), dejándose en claro que la cantidad de gotas lipídicas afecta la tolerancia a la congelación.

La vía por la cual las GLs afectan la sensibilidad embrionaria a la criopreservación es desconocida, no obstante, se piensa que está relacionada al estrés oxidativo generado durante el proceso de criopreservación. Se sabe que tanto durante la congelación como en la descongelación se producen EROs [29](#), sin embargo, la concentración de éstas es mayor cuando una gran cantidad de GLs está presente y menor si los embriones son delipidados [29](#). Si las EROs no son controladas mediante un sistema antioxidante, sus efectos son mortales. Esto se ha visto en embriones bovinos *in vitro* en los cuales conforme aumentaba la cantidad de GLs por área incrementa también el porcentaje de apoptosis (18 GLs / 1000 μm^2 – 16 % apoptosis; 57 GLs / 1000 μm^2 – 69 % [30](#)).

Dado que los porcentajes de viabilidad de embriones con alto y bajo contenido lipídico son muy parecidos a los reportados en *B. indicus* (16-54%) y *B. taurus* (41-70%), respectivamente [8-12](#); y la frecuencia de daños ultraestructurales relacionados a embriones de alto contenido lipídico (lisis, hinchamiento y muerte celular) son mayores en la primera subespecie *versus* la segunda [58](#), la posibilidad de que los embriones *B. indicus* posean una gran cantidad de GLs es alta.

2.3.1.2 Efecto de la composición

Por otra parte, se ha visto que la viabilidad de los embriones tras congelación por curva lenta no solo es afectada por la cantidad de GLs sino también por la composición y el tamaño de las GLs. La composición de los fosfolípidos de membrana es una

característica importante, ya que de ella depende la temperatura de solidificación o congelación. Tanto la cantidad de ligaduras (saturados o insaturados) y tipo (*cis* y *trans*) como el largo de la cadena hidrocarbonada confieren o restan tolerancia al enfriamiento. Es decir que el cambio de la flexibilidad de la membrana durante el proceso de congelación se observará tempranamente en lípidos cuya composición sea de ácidos grasos saturados, de tipo *cis* y de cadena corta [80.81](#). Por ejemplo, la temperatura de transición de estado fluido a sólido de la fosfatidilcolina (FC) en ácidos grasos con cadenas de 12, 14, 16, 18 y 20 carbonos es de 0, 23, 41, 55 y 66 °C, respectivamente [81](#). Los ácidos *cis*-oleico (18:1) *cis*-linoleico (18:2) y *cis*-linolénico (18:3) presentan temperaturas de cambio de fase de 15, -5 y -11°C, respectivamente, mientras que los *trans*-oleico (18:1), *trans*-linoleico (18:2) y *trans*-linolénico (18:3) tienen temperaturas de 47, 69 y 70 °C, respectivamente [80](#). Estos ejemplos muestran claramente el efecto del largo de la cadena hidrocarbonada y el tipo de ligadura sobre la temperatura de solidificación, por lo que se puede concluir que los ácidos grasos insaturados tienen una mejor flexibilidad de membrana en comparación con los ácidos grasos saturados [20](#).

Estudios tanto de embriones como de semen han demostrado que la adición de ácidos grasos saturados – como palmítico (16:0) y esteárico (18:0) – tiene un efecto negativo en la criotolerancia [82](#). Por el contrario, la suplementación de ácidos grasos insaturados en medios de cultivo aumenta su resistencia al enfriamiento [20.50.83](#).

Tomando en cuenta que los fosfolípidos de embriones *B. indicus* contienen menos ligaduras, cadenas más cortas (FC 32:1) y abundancia en ácidos palmítico (16:0) y esteárico (18:0) *versus* los embriones *B. taurus* (FC 34:2, ácidos linoleico 18:2; Sudano et al., 2012) creemos que la solidificación de su membrana ocurrirá tan pronto como comience el enfriamiento, de forma que el cambio de su flexibilidad promoverá la generación de EROs, limitando la deshidratación y formando cristales de hielo

intracelular, promoviendo muerte celular ya sea mecánicamente por efecto de los cristales de hielo o inducidos por apoptosis.

2.3.1.3 Efecto del tamaño

El tamaño de las GLs confiere propiedades distintas a las células [84](#); en embriones bovinos *in vitro* las GLs de diámetros grandes (de 2 a 6 μm) tienen menores porcentajes de sobrevivencia (de 79 a 46 %) y eclosión (42 a 23 % [17,19](#)) que los diámetros chicos, y la reducción de tamaño a través de un agente lipolítico acrecienta su criotolerancia, incrementando los porcentajes de preñez de 19 a 49% [85](#). Además de que las GLs están en sintonía con la producción de EROs, se ha demostrado que un tamaño grande de gota lipídica produce una mayor concentración de hidroperóxidos que una gota chica [21](#). Por lo tanto, creemos que es importante analizar también el tamaño de las gotas entre subespecies, ya que este factor podría ser una razón más para la promoción de estrés oxidativo en los embriones *B. indicus* y por tanto de la disminución de la viabilidad.

2.3.2 Alteraciones metabólicas y bioquímicas inducidas por la congelación-descongelación: Especies reactivas de oxígeno, peroxidación lipídica y apoptosis

El proceso de congelación-descongelación genera EROs [79](#) debido a los cambios metabólicos y bioquímicos que ocurren durante la hipotermia, hipoxia (congelación) y re-oxigenación (descongelación). Este incremento excesivo de EROs provoca eventos de peroxidación lipídica y apoptosis, restando viabilidad a los embriones. Durante la disminución de temperatura, el metabolismo y la actividad de la membrana plasmática se ven afectados, disminuyendo en consecuencia la eficiencia de las bombas de ATP. Esto provoca un cambio en el gradiente iónico de membrana y peroxidación lipídica [76,77](#), la cual a su vez, por la reacción en cadena, genera radicales

libres. Aunado a esto, la hipoxia promueve la degradación de glicógeno y aumento de glucólisis, a fin de mantener los niveles de ATP [86.87](#); sin embargo, al experimentarse una isquemia prolongada, los niveles de ATP caen, el AMP aumenta, y los gradientes de iones son destruidos. Posteriormente, el AMP es degradado, la hipoxantina se acumula generando $O_2^{\cdot -}$ en su conversión a xantina y por ende bloqueando las divisiones mitóticas [88](#), el Ca^{2+} intracelular incrementa, estimulando las proteinasas y fosfolipasas [86.89](#), observándose cambios en la composición de los fosfolípidos de membrana [90](#).

Por otra parte, el proceso de re-oxigenación en la descongelación implica un aumento abrupto de oxígeno el cual, a través de los pasos intermedios de su reducción [91](#), genera radicales libres como el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), los cuales dañan directamente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos [91-93](#). De esta forma se observa como todos los cambios metabólicos y bioquímicos que experimentan las células durante la congelación y descongelación llevan a un incremento de EROs [79](#).

Las EROs son generadas durante el metabolismo embrionario normal [91](#) y en concentraciones normales sirven como segundos mensajeros en vías de señalización [94](#), pero un aumento desmesurado rompe el balance oxido-reducción (REDOX) ocasionando estrés oxidativo [95](#). Una de las estrategias celulares para contrarrestar el estrés oxidativo son los antioxidantes, pero tras el ciclo de criopreservación éstos disminuyen [96-99](#) y las altas concentraciones de EROs dañan lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, desencadenando así eventos de peroxidación lipídica y apoptosis.

La oxidación lipídica genera un cambio en el potencial de membrana y baja la resistencia eléctrica, incrementándose el flip-flop de la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina entre las dos monocapas de lípidos. Debido a que las proteínas de membrana se cruzan, también aumenta la viscosidad y en consecuencia su movilidad rotacional y lateral disminuye. No obstante, su máxima inmovilización se

observa cuando los hidroperóxidos de la peroxidación lipídica promueven la formación de enlaces cruzados en las proteínas [100.101](#). Además de esto, se inactivan los receptores y enzimas de membrana, incrementando la permeabilidad de iones como el Ca^{2+} [102](#). Estas alteraciones, al cambiar la flexibilidad de la membrana, pueden repercutir sobre la deshidratación del embrión, ya que una incorrecta reducción de volumen hídrico creará la formación de cristales intracelulares rompiendo mecánicamente las células.

Si las células logran sobrevivir a la descongelación, los altos niveles de peroxidación lipídica promoverán alteraciones de funcionalidad mitocondrial [103.104](#) rompiendo la cadena transportadora de electrones y formando más $\text{O}_2^{\cdot -}$ [105](#). Simultáneamente la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial aumenta liberando citocromo *c*, que activará mecanismos de apoptosis e inhibirá el desarrollo embrionario [106-109](#).

Otro de los efectos de la peroxidación lipídica es el cambio de composición de los ácidos grasos. Los ácidos grasos polinsaturados son por excelencia susceptibles a la peroxidación debido a que los radicales libres substraen un átomo de hidrógeno de un grupo metilo (CH_2). Las dobles ligaduras son los lugares más susceptibles a perder el átomo de hidrógeno, por lo que en cada oxidación existe un reacomodo de la cadena hidrocarbonada reduciendo el número de ligaduras que caracterizan a los ácidos polinsaturados, generando productos como isofuranos y aldehídos, entre otros [102.110](#).

La apoptosis puede ser activada por diferentes vías tras el proceso de criopreservación. Una de ellas depende directamente de la peroxidación lipídica, la cual tras la externalización de la fosfatidilserina, induce la activación de caspasas suscitando la fragmentación del ADN y por ende la apoptosis [111](#). Otra de las vías involucra la oxidación del fosfolípido cardiolipina, favoreciéndose la permeabilidad de la membrana mitocondrial y liberación del citocromo *c*, el cual es un activador de apoptosis [105](#). Una tercera ruta, se relaciona directamente con las EROs, las cuales, al

estar en contacto con el ADN, rompen sus cadenas y modifican, eliminan o entrecruzan sus bases [112](#).

No obstante, ni el $O_2^{\bullet -}$, ni H_2O_2 reaccionan con el ADN, por lo que el daño se le ha atribuido directamente al radical OH^{\bullet} . El H_2O_2 tiene la facilidad de cruzar membranas y llegar al núcleo, que tras reaccionar con iones como hierro (Fe^+) y cobre (Cu^+), forman al radical OH^{\bullet} . Éste, dada su alta reactividad e inhabilidad de desplazamiento a distancias significativas dentro de la célula, altera químicamente al ADN. Además de la existencia natural de metales en el ADN, la hipoxia a través del aumento de Ca^{2+} intracelular incrementa las concentraciones de Fe^+ y Cu^+ , facilitando así la formación del radical OH^{\bullet} [113](#).

Otro camino para la activación de apoptosis implica la activación de endonucleasas. Esto sucede porque la inactivación de la ATPasa (adenina nucleótido translocasa), situada en la membrana mitocondrial interna facilita la acumulación de calcio en la matriz mitocondrial, ocasionando que el poro se abra y salga Ca^{2+} aumentando sus niveles en citosol. Tras aumentar la concentración de calcio citoplasmático, la activación de endonucleasas producirá la fragmentación del ADN conduciendo a apoptosis [112,113](#). Por lo tanto, cualquiera que sea la vía de activación, la apoptosis está íntimamente ligada al estrés oxidativo.

Algunos estudios expresan la relación de las EROs con la apoptosis. En embriones humanos, Yang y colaboradores [109](#) mostraron que las concentraciones de H_2O_2 son significativamente altas en embriones fragmentados comparados con los no-fragmentados (72 vs. 31 a.u., unidades arbitrarias de fluorescencia), de forma que a mayor cantidad de EROs mayor proporción de células apoptóticas [114](#).

Se ha visto que el estrés oxidativo producido durante la criopreservación aumenta significativamente los núcleos apoptóticos [115](#). Estudios con embriones bovinos

frescos *in vivo* sometidos a un proceso de cultivo para evaluar su viabilidad manifestaron un bajo índice apoptótico modulado por la calidad embrionaria. Es decir que los embriones de buena calidad presentan menor número de apoptosis mientras que los regulares y malos tienen más (10, 12, 27, respectivamente, [116](#)); sin embargo, después de la congelación-descongelación el número de células apoptóticas incrementó de 10 a 13 en embriones buenos y de 12 a 20 en embriones regulares [115,117](#). Estos precedentes apoyan la idea de que las alteraciones metabólicas y bioquímicas producidas por el proceso de congelación desencadenan eventos de estrés oxidativo, repercutiendo sobre la peroxidación lipídica y la apoptosis, provocando posiblemente la pérdida de éxito en su subsiguiente desarrollo.

Basados en los efectos que el proceso de criopreservación tiene sobre las células y las diferentes características que los embriones *B. indicus* y *B. taurus* presentan entre sí, creemos que la baja viabilidad de los embriones *B. indicus* post-descongelación se debe a las propiedades de sus GLs sobre su resistencia al enfriamiento y congelación, de forma que posiblemente tendrán un mayor daño celular a través de la peroxidación lipídica y la apoptosis. El objetivo del presente proyecto es caracterizar y comparar la cantidad, volumen, morfología y composición de las GLs; así como los niveles de EROs, PL y apoptosis de los embriones de *B. indicus* y *B. taurus* producidos *in vivo* antes y después de la congelación de curva lenta.

Hipótesis

Los embriones *B. indicus* presentarán una mayor cantidad de gotas lipídicas y exhibirán un mayor grado de estrés oxidativo al momento de la descongelación promoviendo altos niveles de peroxidación lipídica y muerte celular con respecto a los *B. taurus*.

Objetivos

1. Caracterizar la organización, tamaño (μm^3), cantidad, morfología y composición lipídica de las gotas lipídicas de embriones *in vivo* en ambas subespecies, *B. indicus* y *B. taurus*, antes y después de la congelación.
2. Determinar el estrés oxidativo y daño a través de la peroxidación lipídica y muerte celular pre y post congelación.

Material y Métodos

Para comparar la cantidad de GLs, su volumen, morfología, composición, niveles de EROs, PL y apoptosis, se utilizaron mórulas C1 de *B. indicus* y *B. taurus* comparando los embriones frescos vs. congelados-descongelados, por curva lenta y en Etilenglicol. La “N” varía por grupo por lo que en las gráficas respectivas se podrá leer el número de embriones usados por condición.

3.1 Obtención de embriones *B. indicus* y *B. taurus*

3.1.1 Razas de los embriones trabajados y ubicación geográfica de las donadoras

Las razas de los embriones *B. indicus* son Brahman y Guzerat. En el caso de los embriones *B. taurus* son Holstein, Suizo Americano, Hereford, Charolais y Maine Anjou, cabe señalar que estas tres últimas razas corresponden a embriones comprados en Estados Unidos.

La manipulación del ganado se realizó bajo el protocolo (DC-2014-04) aprobado por el Subcomité Institucional del Cuidado y Uso de Animales en Experimentación de la Universidad Nacional Autónoma de México (SICUAE-UNAM).

La ubicación geográfica de las donadoras correspondió a regiones donde su potencial productivo es expresado. De esta manera, los embriones *B. taurus* provienen de la región centro de México (20° 16' latitud norte y 98° 56' longitud oeste, altitud 2001 m sobre el nivel del mar, temperatura promedio media anual 16.4°C, precipitación anual 390.1mm)¹ y algunos embriones congelados de Estados Unidos (éstos fueron comprados). Los embriones *B. indicus* proceden de la región sureste (17° 59' latitud

¹ [https://es.wikipedia.org/wiki/Actopan_\(Hidalgo\)#Geograf.C3.ADa](https://es.wikipedia.org/wiki/Actopan_(Hidalgo)#Geograf.C3.ADa)

norte y 92° 55' longitud oeste, altitud 10m sobre el nivel del mar, temperatura media anual 27.1°C, precipitación anual 1960.9mm)² y oriente de México (20° 57' latitud norte y 97° 24' longitud oeste, altitud 10m sobre el nivel del mar, temperatura media anual 24.9°C, precipitación anual 1241mm)³.

3.1.2 Selección y dieta de donadoras

Para la selección de las donadoras se escogieron aquellas que no presentaran problemas reproductivos ni alteraciones anatómicas que interfirieran con la fertilidad (vaca repetidora, endometritis, tumores, adherencias, quistes). De uno a tres partos (de preferencia uno), de 70 a 150 días en producción de leche (en el caso de las *B. taurus*) y una condición corporal 2.75 a 3 en ganado lechero y 5.5 a 6.5 en ganado de carne [118,119](#), pelo brillante, sanas y alerta. Una vez seleccionadas no se movieron de corral ni de grupo, administrándoseles selenio con vitamina E (10mg/50kg/IM, MU-SE, Intervet Shering-Plough, USA) y vitaminas ADE (6mL/IM Vigantol ADE Fuerte, Bayer, Alemania) al inicio y 7 días después de la selección.

La dieta de las donadoras dependió de cada rancho. Por lo que respecto al ganado *B. taurus*, consumían una mezcla de alfalfa, maíz, pasta de soya, pasta de canola, cítricos, grasa de sobrepeso, vitaminas y minerales. Por su parte, la dieta del ganado *B. indicus* se basó en las gramíneas Estrella de África (*Cynodon plectostachyus Vanderyst*) e Insurgente (*Brachiaria brizantha*) y leguminosas Guaje (*Leucaena leucocephala*), agua y sales minerales *ad libitum* con lo cual cubrían sus requerimientos de mantenimiento para un peso promedio de 500kg [120](#) sin caer en eventos de desnutrición o sobrealimentación que comprometiera la reproducción [121](#).

3.1.3 Producción de embriones

² [https://es.wikipedia.org/wiki/Villahermosa_\(Tabasco\)#Clima](https://es.wikipedia.org/wiki/Villahermosa_(Tabasco)#Clima)

³ [https://es.wikipedia.org/wiki/Municipio_de_Tuxpan_\(Veracruz\)#Clima](https://es.wikipedia.org/wiki/Municipio_de_Tuxpan_(Veracruz)#Clima)

El programa de sincronización y ovulación múltiple hasta la colecta de embriones tuvo una duración de 31 días, tomando como día cero el inicio de la sincronización. De esta forma el día cero, se insertó vía intravaginal un dispositivo liberador de progesterona (1.9g, CIDR, Pfizer, USA) más la administración intramuscular de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH, 75mcg/IM, Dalmarelin-RH, Schütze-Segen, Mexico). Siete días después, el CIDR fue retirado y al mismo tiempo se administró prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$, 25 mg/IM, Lutalyse, Pfizer, USA), procediéndose a la detección de celos 48h después. Alrededor del día 15 un nuevo CIDR fue implantado además de la administración de $17-\beta$ estradiol (15 mg/IM, Estilbo, Syva, España) y progesterona (P_4 , 50 mg/IM, Progesterona, Fort Dodge Animal Health, USA). En el día 19, el programa de ovulación múltiple inició con la administración de dosis decrecientes de la hormona folículo estimulante (FSH-P1, dosis total 260mg y 360mg para *B. indicus* y *B. taurus*, respectivamente; Folltropin V® Bioniche, Canadá) dos veces al día por 4 días consecutivos. El último día de la ovulación múltiple, además de la inyección de FSH se aplicó por mañana y tarde $PGF_{2\alpha}$, retirándose el CIDR por la tarde. Los celos se esperaban para el día 24, los cuales una vez detectados se inseminaban las vacas a las 0, 12 y 24h con semen congelado de la misma raza que la donadora.

Los embriones fueron colectados por el método no-quirúrgico entre los días 6 a 6.5 después de iniciado el celo, con la finalidad de obtener embriones en estadio de desarrollo de mórulas. Una vez colectados, se buscaron y clasificaron en tres calidades (C1, C2, y C3) según los criterios de la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones (IETS, por sus siglas en inglés) ¹²² utilizando para ello microscopía estereoscópica (Indu VU 5000 series, Wesco).

3.1.4 Congelación, descongelación y re-hidratación de embriones

Para la congelación de curva lenta, los embriones fueron puestos en etilenglicol (Vigro Ethylene Glycol Freeze Plus w/Sucrose, Agtech, USA) durante 5min; este tiempo

incluye el cargar los embriones a las pajillas de 0.25mL y sellarlas. Transcurridos estos minutos, las pajillas se colocaron en la congeladora automática (CL5500, Cryologic Pty. Ltd., Australia), equilibrada previamente a -6°C. Después de 2min de estabilización a esta temperatura, se indujo el seeding, seguido de, la congelación. Antes de que la temperatura iniciara su descenso a una tasa de 0.3°C/min, el periodo de estabilización post-seeding duró 10min, mismo tiempo que se esperó una vez que los embriones llegaron a -32°C, para después ser sumergidos directamente en nitrógeno líquido.

Para la descongelación, las pajillas se mantuvieron 5 seg en el aire y después se sumergieron en baño María a 30°C por 30 seg. Los embriones provenientes de Estados Unidos se descongelaron bajo las indicaciones del proveedor, las cuales fueron, mantener la pajilla 5 seg en el aire y sumergir después en baño María a 24°C durante 20 seg.

La rehidratación se llevó a cabo por un lapso de 10 minutos. Para tal fin, en una caja de Petri de 6 pozos (Cat. D18, 6 well Dish Solution, Agtech, USA) el embrión fue depositado en el primer pozo, transfiriéndolo inmediatamente al segundo pozo con el mínimo de crioprotector, y a su vez a un tercero que contenía 200µL de medio Holding (Holding Vigro Plus, Vetoquinol, Canada) a 30°C o 24°C según la temperatura de descongelación. Tras varios pipeteos para homogenizar el medio, el embrión fue puesto en el siguiente pozo con 200µL de medio Holding a la temperatura del pozo anterior y puesto a incubar (Labnet, Labnet International, Inc, Edison NJ, USA) durante 4 minutos a 37°C. Dos cambios más de medio Holding a 37°C fueron hechos pero con 300µL y 400µL durante 4 y 2 minutos, respectivamente.

3.2 Determinación de cantidad, volumen, morfología y composición de las gotas lipídicas

3.2.1 Determinación de cantidad y volumen

Para determinar la cantidad y el volumen de las GLs de cada embrión se utilizó la tinción fluorescente rojo de Nilo. Los embriones con la condición de frescos fueron fijados inmediatamente tras la asignación de su calidad y los embriones congelados después de experimentar la descongelación. La fijación se llevó a cabo con solución Karnovsky modificado (glutaraldehído al 2.5%-paraformaldehído al 1% (pH 7.2)) a 4°C por 24h y después lavados en PBS-Dulbecco (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y teñidos durante toda la noche en 10µg/mL de rojo de Nilo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) protegidos de la luz. Después los embriones fueron lavados en solución salina fisiológica (NaCl 0.9%) con polivinilpirrolidona (1mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y montados entre cubreobjetos recubiertos previamente con poli-L lisina al 30% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) usando como medio de montaje DAKO (Dako North America Inc, Carpinteria, CA, USA). Para evitar que el embrión se deformara por el uso del cubreobjeto que recubre el embrión y por ende se fusionaran las gotas, el uso de éste se evito. Una vez montados, la toma de imágenes se realizó de manera inmediata, debido a que con el paso del tiempo la tinción comenzaba a difundirse en todo el embrión.

3.2.2 Adquisición y análisis de imágenes para determinar cantidad y volumen

Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio vertical multifotónico (Olimpus BX61WI) perteneciente al Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada (LNMA) utilizando un objetivo de inmersión en agua de 25X PlanN NA 1.05 W MP. La línea de excitación de rojo de Nilo fue de 900nm (MaiTaiDeepSea HP: 690nm-1040nm; Spectra Physics, USA) colectando su emisión en un fotomultiplicador que refleja la luz a través de un espejo dicróico (FV10-MRG/R: DM570) y filtros de emisión de 575-630nm (FV10-MRG/R: BA575-630). Para cada embrión, la información adquirida se registró en un Z stack (secciones ópticas de la muestra sin necesidad de rebanar la muestra,

donde las tres dimensiones X-Y-Z son registradas). Entre cada sección óptica del eje Z existió una separación de $0.5\mu\text{m}$ de intervalo.

Para corregir la distorsión espacial inducida por el sistema óptico conocido como Point Spread Function (PSF), que causa una visualización alargada de las GLs, las imágenes fueron deconvolucionadas (algoritmo usado para la restauración de la imagen degradada por el ruido y difracción de la luz). Para eso, se utilizaron pelotitas fluorescentes calibradas (Focal Check F36909 slide, Invitrogen, Molecular Probes, USA) bajo las mismas condiciones que los embriones experimentales; deconvolucionándose en el programa ImageJ [123](#) utilizando la herramienta “parallel Iterative Deconvolution” [124](#).

Después de que las imágenes fueron deconvolucionadas, con el propósito de mejorar la relación señal-ruido (SNR, Signal to Noise Ratio), se aplicó sobre las imágenes un filtro de ruido Gaussiano (o normal, con un radio Kernel de 0.5 au (unidades arbitrarias) [125](#) y ecualización de niveles de grises.

Para cuantificar y medir el volumen de cada GL, las imágenes se analizaron mediante un programa de segmentación semi-automatizado (desarrollado específicamente para estas imágenes por el LNMA), que permite la selección de cada gota de manera individual. Este programa ofrece una vista ortogonal, de forma que al seleccionarse cada una de las gotas, su visualización en los planos X, Y y Z permite identificar si la gota es individual o forma parte de algún grupo de gotas, procediendo a su segmentación. Después de la segmentación los parámetros geométricos son desplegados obteniéndose el volumen en μm^3 . Los datos obtenidos como el número y volumen de cada gota fueron ordenados y analizados. Para evitar la variación individual de tamaño de cada embrión, es decir, que un embrión grande tuviera obviamente más gotas que uno chico, el número de gotas fueron normalizadas al volumen de cada embrión. Para la normalización se dividió el número total de gotas

entre el volumen de cada embrión, expresándose de primera instancia los valores en número de gotas por micra cúbica (#GLs/ μm^3); sin embargo, para una mejor comprensión los valores se expresaron en porcentaje. El volumen del embrión fue calculado utilizando la fórmula $V = 4/3\pi r^3$ (Ziebe, 2014). Para esto, el diámetro de sólo la masa embrionaria fue medido (la zona pelucida no se toma en cuenta), introduciendo el valor de radio a la fórmula. Con respecto a la variable volumen, ésta no se normalizó.

3.2.3 Determinación de morfología y composición

Para determinar la morfología y composición (saturada o insaturada) los embriones fueron procesados para microscopía electrónica de transmisión y fotografiados en su totalidad al nivel del corte (en promedio 30 células por embrión). Para evitar pérdida de información por las barras en las rejillas de soporte, se utilizó la rejilla de un solo agujero.

3.2.4 Procesamiento de embriones para microscopía electrónica de transmisión

Primeramente, los embriones se fijaron por inmersión en fijador Karnovsky modificado (glutaraldehído al 2.5%-paraformaldehído al 1% (pH 7.2)) a 4°C por 24h. Posteriormente se lavaron en solución amortiguadora a base de cacodilato de sodio (0.1M, pH 7.4), seguido de la post-fijación con tetróxido de osmio (OsO_4) al 1% durante 1h. La deshidratación se realizó en concentraciones ascendentes (70, 80, 90, 95 y 100%) de alcohol etílico con intervalos de 20 minutos en cada una. La infiltración se hizo con EPON812 (Pelco Internacional, México), colocando primeramente los embriones en acetonitrilo, con dos cambios de 20min, y después en diluciones de resina 1:1 (acetonitrilo: EPON812) y 2:1 cada una con un tiempo de 1h. En el último paso, los embriones se pusieron en moldes con EPON812 puro por 24h a temperatura ambiente y posteriormente polarizados en una estufa a 60°C por 24h.

El siguiente paso, fue realizar los cortes semifinos de 1 μ m los cuales tenían la finalidad de determinar el nivel de corte para los finos (50-70nm), ambos tipos de cortes fueron hechos en un ultramicrotomo (Leica). Los primeros fueron teñidos con azul de Toluidina al 0.5% y los segundos contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo, para después ser montados en rejillas de un solo agujero y observados bajo microscopia electrónica de transmisión (Jeol, 1200 EXII).

3.2.5 Análisis de imágenes de morfología y composición de las gotas lipídicas

La morfología de las GLs fue clasificada como craquelada (presencia de grietas en la superficie de la GL) y homogénea. La cuantificación se llevó por célula y por embrión. La cantidad de cada uno de los tipos morfológicos se normalizo al área citoplasmática de cada imagen.

La composición de las GLs (saturadas o insaturadas), fue estimada sobre las imágenes de MET, esto tomando en consideración que el OsO₄ se reduce a dióxido de osmio (OsO₂) negro por las dobles ligaduras de los lípidos, confiriéndole electro densidad al espécimen [80](#). Fujimoto y colaboradores [126](#) describen que una alta electro densidad es representada por lo ácidos grasos insaturados, mientras que una baja electro densidad corresponde a la presencia de ácidos grasos saturados. Para cuantificar la electro densidad, se utilizaron imágenes de 8-bits en una escala de grises, donde el color negro representa alta electro densidad y tiene un valor de 0au y el blanco representa poca electro densidad con un valor asignado de 255au. Con estos valores establecidos, la electro densidad de las GLs fue determinada. Para ello, se dibujó un ROI (Region of Interest) dentro de la superficie de la GL evitando las grietas blancas que se observan en las gotas craqueladas y por medio del programa ImageJ se calcula el promedio de grises que está dentro del ROI. Después, debido a las posibles diferencias de electro densidad por el procedimiento de contraste, las mediciones se normalizaron al promedio de grises del citoplasma de cada célula, restando este valor

al de la GL. De esta manera, las gotas que presentaran valores cercanos a 255au (blanco) corresponden a gotas de composición saturada mientras que aquellas con valores aproximados al 0au (negro) representan una composición de ácidos grasos insaturados. Como control de estas mediciones, dos puntos de referencia en cada imagen fueron tomados, para el blanco (255au) se tomó un área de la resina y para el negro algún precipitado o la propia rejilla, ello según la imagen lo permitiera.

3.3 Determinación de especies reactivas de oxígeno, peroxidación lipídica y apoptosis

3.3.1 Determinación de especies reactivas de oxígeno

Para determinar la cantidad de EROs que poseen los embriones de ambas subespecies antes y después de la congelación, los embriones, se incubaron a 37°C en una molécula pro-fluorescente (CellRox Green, Invitrogen Molecular Probes, USA), que al ser oxidada por EROs emite fluorescencia, la cual podemos medir en a.u. Los embriones experimentales, ya sea frescos o recién descongelados-rehidratados, se incubaron (Labnet International, Inc, Edison NJ, USA) en 200 µL de CellRox Green a 5 µM en medio Holding a 37°C por 30min protegidos de la luz. Pasado ese tiempo, los embriones se lavaron dos veces en gotas de medio Holding a 37°C y se fijaron en paraformaldehído (PFA, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) al 4% a temperatura ambiente por 15 min. Se enjuagaron tres veces en gotas de D-PBS (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) con polivinilpirrolidona (PVP, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) como surfactante (1mg/mL) y se tiñeron los núcleos con DAPI (Invitrogen, Molecular Probes, USA) durante 15 min. De nuevo se lavaron tres veces en gotas de D-PBS/PVP y se montaron entre cubreobjetos previamente preparados con Poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) al 30% utilizando 15 µL de medio de montaje Dako (Dako North America Inc, Carpinteria, CA, USA). La adquisición de imágenes se realizó dentro

de las primeras 24h en que los embriones fueron incubados en CellRox Green ya que de no hacerlo las muestras perdían su fluorescencia.

Debido a que los embriones tienen altos niveles de autofluorescencia comparado con otros tipos celulares [127](#), se prepararon dos embriones controles negativos por cada tratamiento (frescos y congelados-descongelados) y por subespecie. La metodología utilizada fue la misma que para los embriones experimentales a excepción del uso del CellRox Green.

Con la finalidad de fijar los parámetros de adquisición de imágenes bajo microscopia confocal, se procesaron dos embriones controles positivos por cada tratamiento y subespecie. La metodología utilizada fue la misma descrita para los experimentales, más la previa incubación (37°C, 30 min) en 100 µM de hidróperóxido de cumeno como agente oxidante [128](#), antes de la adición de CellRox Green.

3.3.2 Determinación de luxes provenientes del microscopio estereoscópico

Debido a que la luz de los microscopios afecta la producción de EROs y por ende la viabilidad [129,130](#), fue necesario determinar la cantidad de luz incidente (iluminancia, lx) en los embriones como control de calidad. Para eso, se caracterizó el espectro de luz de la fuente lumínica mediante un espectrofotómetro (Ocean Optics Hr4000) en los 4 niveles de intensidad de luz que el microscopio estereoscopio presentaba, así mismo la cantidad de energía (potencia) asociada a cada una de las longitudes de onda determinadas (500, 550, 600, 620, 625nm) a través de un potenciómetro (Coherent, LabMaster Ultima). La potencia fue obtenida en watts (W) unidad del sistema radiométrico por lo que tuvo que ser convertida a lux (lx) unidad fotométrica. Para dicha conversión se utilizó la fórmula $LX = (1/\text{factor} * V) * (W/A)$. Donde lx =lux, factor = factor de conversión específico para cada longitud de onda ([Cuadro 1](#)), V= factor de ajuste Gaussiano, W= watts, A= área del detector del potenciómetro

expresado en m². Dicha conversión se realizó con el programa Photopic2 en la plataforma de MATLAB. Encontramos que el espectro de luz del foco del microscopio osciló de 500 a 625nm presentando en el primer nivel del microscopio una iluminancia de 424 lx, el segundo nivel de 1104 lx, el tercer nivel de 1999 lx y el cuarto, siendo el nivel máximo, de 3249 lx. Estos datos corresponden a parámetros bien tolerados por los embriones [130,131](#).

3.3.3 Determinación de peroxidación lipídica

La habilidad de los embriones para oxidar lípidos antes y después de la congelación fue detectada mediante el uso del kit Click-iT LAA (Invitrogen Molecular Probes, USA). El ácido linoleico modificado con alquino (LAA), que forma parte del kit, se incorpora a las membranas celulares que tras su oxidación produce hidroperóxidos, los cuales se propagarán dependiendo de la proporción de proteínas en la membrana [102](#); modificándose las cadenas laterales nucleófilas de las proteínas, las cuales son identificadas por fluorescencia. Para tal identificación, los embriones frescos y descongelados-rehidratados fueron primeramente incubados en 200 µL de medio Holding con una concentración de 50 µM de ácido linoleico modificado-alquino (LAA) a 37°C durante 15min, después se lavaron 3 veces en gotas de Holding a 37°C y se fijaron en PFA 4% por 15min a temperatura ambiente. Después se lavaron 3 veces en D-PBS/PVP y se permeabilizaron en tritón X-100 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) 0.5% en PBS por 10 min a temperatura ambiente; para detener la permeabilización se pasaron a BSA 1% por 30min. Se preparó el cóctel de reacción del kit incubando los embriones por 30min a temperatura ambiente protegidos de la luz. Se removió el cocktail y se enjuagaron los embriones de nuevo en BSA 1% dos veces y después en D-PBS/PVP, se tiñeron los núcleos con DAPI por 15 min y se montaron entre dos cubreobjetos previamente preparados con Poli-L-lisina 30% utilizando medio de montaje Dako.

Para conocer los valores de autofluorescencia se prepararon embriones controles

negativos los cuales llevan todo el procedimiento descrito a excepción de la adición de ácido linoleico. Por otra parte, para fijar los valores de máxima fluorescencia y ajustar los parámetros de adquisición en el microscopio confocal, se dispusieron embriones como controles positivos, los cuales además de la adición del ácido linoleico fueron sometidos a oxidación utilizando hidroperóxido de cumeno a una concentración 100 μ M 37°C por 30 min protegidos de la luz.

3.3.4 Determinación de apoptosis

Para detectar la muerte celular programada se utilizó la prueba TUNEL, TdT dUTP Nick End Labelling (Versión 11, In Situ Cell Death Detection kit, Roche Molecular Systems Inc. Pleasanton, CA, USA). Esta técnica tiene como objetivo detectar la rotura de las cadenas del DNA mediante la adición del nucleótido marcado desoxiuridina trifosfato (dUTP) al fragmento roto de la cadena del DNA por medio de la enzima Terminal deoxinucleotidil Transferasa (TdT). Para tal fin, los embriones frescos o recién descongelados-rehidratados se fijaron en PFA 4% por 60min a temperatura ambiente, seguido de lavados en gotas de PBS/PVP, y permeabilizados por inmersión en 200 μ L de 0.1% Tritón X-100/ 0.1% citrato de sodio (Sigma-Aldrich, USA) pH 7.4 durante 30min en hielo. El siguiente paso, involucró la incubación de los embriones a 37°C por 60 minutos en una atmósfera húmeda y protegidos de la luz en fluoresceína dUTP y TdT. Finalmente se enjuagaron en PBS/PVP contrastándose los núcleos con DAPI por 15min, se enjuagaron de nuevo en PBS/PVP y se montaron entre cubreobjetos previamente preparados con poli-L-lisina 30% utilizando medio de montaje Dako. Para vigilar la calidad de la técnica se usaron embriones controles negativos y positivos. Los primeros llevaron todo el procedimiento omitiendo la enzima transferasa (TdT). Los segundos, fueron incubados 10min antes de TUNEL en DNAasa I recombinante (1000U/mL) a temperatura ambiente, para inducir el rompimiento de las cadenas de DNA.

3.4 Adquisición y análisis de imágenes para detectar especies reactivas de oxígeno, peroxidación lipídica y apoptosis

3.4.1 Adquisición de imágenes

Los parámetros de adquisición fueron uniformes en todos los embriones de cada técnica y se establecieron con base al control positivo de la subespecie que registrara mayor intensidad de fluorescencia, en este caso fueron los embriones de tipo *B. indicus* congelados. La adquisición de imágenes se realizó en un microscopio confocal (Leica TCS SP8, Alemania) con un objetivo HC PL Fluotar 20X/0.50 seco perteneciente a la Unidad de Imagenología Cuantitativa (UnICua) de la Facultad de Ciencias UNAM. Para la detección de EROs, PL y apoptosis se usó la línea del láser diodo 488nm con una excitación/emisión 485/520nm, 488/519nm y 450-500/515-565nm, respectivamente. Para DAPI la línea de láser 405nm con una excitación/emisión de 359/461nm. La imágenes fueron adquiridas con el software Leica application suite X (LAS X) donde cada canal (luz transmitida, DAPI, y el respectivo de cada técnica) fue tomado por separado en los ejes X, Y, y Z juntándose en una composición y guardándose las imágenes en formato tipo TIF.

3.4.2 Análisis de imágenes

Para la cuantificación de intensidad de fluorescencia de las imágenes correspondientes a EROs y PL (valor promedio de grises), así como el conteo de células positivas a TUNEL se usó el programa Fiji is Just ImageJ (<https://fiji.sc/>). En las primeras dos metodologías, el merge de las imágenes fue dissociado en los tres canales que lo constituyen (imagen de luz transmitida, DAPI y EROs/PL/apoptosis). El canal de interés (EROs/PL/apoptosis) se convirtió en una imagen de máxima intensidad sobre la cual cada célula fue delimitada como un ROI; calculándose el valor promedio de grises sobre la imagen (8 bits). A cada valor calculado, se le restó el

promedio, de 4 puntos de fondo; con lo que se obtuvo la intensidad de fluorescencia por embrión. Más aún, con la finalidad de eliminar la autofluorescencia presente en los embriones, al resultado total por embrión, se le resto el promedio de la fluorescencia basal evaluada en los controles negativos (Figura 1.).

Para el análisis de las imágenes de apoptosis se contabilizaron los núcleos positivos a TUNEL.

3.4.3 Análisis estadístico para cantidad, volumen, morfología, composición, EROs, PL y apoptosis

El número de gotas lipídicas fue evaluado en proporciones de gotas individuales, en grupo y porcentaje de grupos por rango de número de gotas, es decir grupos de 2-3, 4-6, 7-9 y >9 GLs. Así mismo, la morfología, composición, niveles de EROs, PL y apoptosis fueron evaluadas mediante la prueba paramétrica t no pareada con una $P < 0.05$.

En relación al volumen individual de las GLs y en grupo por rango de gotas (2-3, 4-6, 7-9 y >9 GLs) la prueba ANOVA de una vía con comparación de medias por TUKEY fue utilizada.

Para saber si las variables volumen de GLs se correlacionaba con EROs y PL, así como el número de grupos de GLs con EROs, el coeficiente de correlación de Pearson (r) fue obtenido. Estos análisis se ejecutaron en el programa GraphPad Prism versión 6.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California, USA, www.graphpad.com).

Cuadro 1. Factores de conversión para diferentes longitudes de onda (λ). En la primera columna se observan las diferentes longitudes de onda en nanómetros (nm) y en la segunda los factores de conversión en unidades de lumen por watt (lm/W).

λ (nm)	Factor de conversión (lm/W)
380	0.027
390	0.082
400	0.270
410	0.826
420	2.732
430	7.923
440	15.709
450	25.954
460	40.980
470	62.139
480	94.951
490	142.078
500	220.609
507	303.464
510	343.549
520	484.930
530	588.746
540	651.582
550	679.551
555	683.000
560	679.585
570	650.216
580	594.210
590	517.031
600	430.973
610	343.549
620	260.223
625	200.223
630	180.995
640	119.525
650	73.081
660	41.663
670	21.856
680	11.611
690	5.607
700	2.802
710	1.428
720	0.715
730	0.355
740	0.170
750	0.082
760	0.041

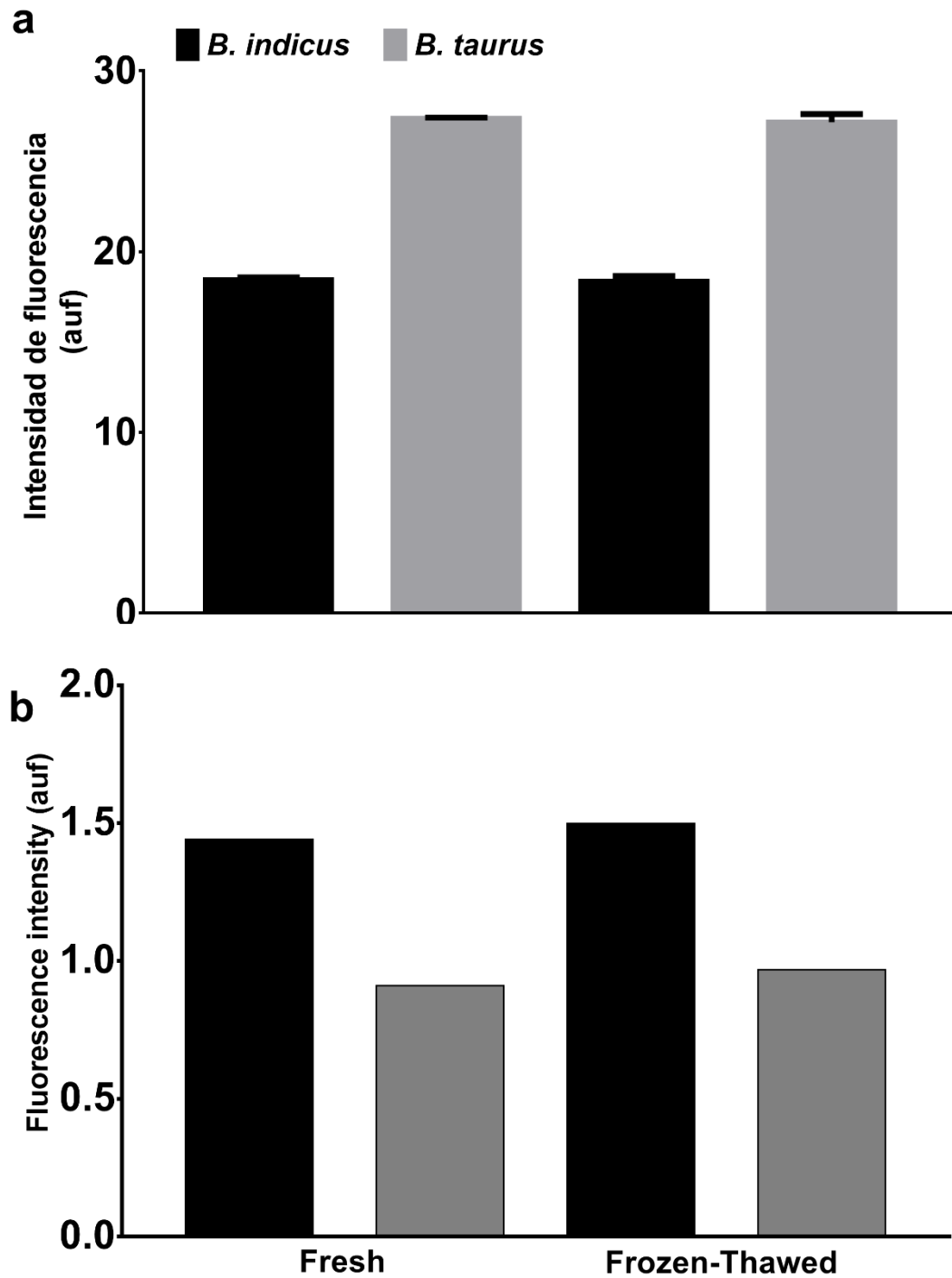


Figura 1. Fluorescencia basal de embriones controles negativos. A) Representación gráfica de los niveles de autofluorescencia para la determinación de EROs. N=1 embrión por condición. B) Representación gráfica de los niveles de autofluorescencia para la determinación de PL. N= 2 embriones por condición.

Resultados

4.1 Cantidad y volumen de gotas lipídicas

Debido a la organización que las GLs presentan, su cuantificación y medida se dividió en dos tipos: individual y en grupos (*Figura 2 A-D*). Aunque en ambas subespecies la organización individual es predominante, los embriones *B. taurus* muestran una mayor proporción de gotas individuales (76 vs. 66%; $P<0.05$) y los *B. indicus* de grupos (34 vs. 24%, $P<0.05$) (*Figura 2 E*). Después del proceso de congelación-descongelación, observamos que la organización de las GLs presenta tendencias inversas entre subespecies; las gotas individuales aumentan en los embriones *B. indicus* (de 66 a 67%, *NS*) y disminuyen en los *B. taurus* (de 76 a 70%, *NS*). De igual manera los grupos de gotas, disminuyen en *B. indicus* (de 34 a 33%, *NS*) y aumentan en *B. taurus* (de 24 a 30%, *NS*) (*Figura 2 E*). A pesar de que los grupos de gotas son minoritarios en ambas subespecies, ocupan el mayor volumen en el embrión (86%, $P<0.05$) (*Figura 2 F*).

De las características que conforman a los grupos de GLs – número de gotas (2-3, 4-6, 7-9 y >9 GLs por grupo), incidencia (%) y volumen (μm^3) – en ambas subespecies predominaron los grupos conformados por 2-3 GLs, aunque en embriones frescos *B. taurus* hay una mayor incidencia (63 vs. 54%, $P<0.05$). Después del proceso de congelación-descongelación la proporción de los grupos de gotas en *B. taurus* disminuye de 63 a 50% ($P<0.05$) mientras que en los embriones *B. indicus* hubo un aumento de 54 a 62% ($P<0.05$).

De igual forma se observaron diferencias importantes en los grupos de >9 GLs entre ambas subespecies. En embriones frescos la incidencia de este tipo de grupos es predominante en los embriones *B. indicus* (11 vs. 2%, $P<0.05$), pero después del proceso de congelación-descongelación los grupos de GLs de *B. indicus* disminuyeron de 11 a 5% ($P<0.05$) y los de *B. taurus* aumentaron de 2 a 7% ($P<0.05$). Cabe mencionar que este tipo de grupos de gotas en la subespecie *B. indicus*, llegan a tener

hasta 36GLs, mientras que los de *B. taurus* no sobrepasan las 12 gotas. No se encontraron diferencias entre subespecies o condición en los grupos de gotas conformados por 4-6 y 7-9 GLs (*Figura 3 A-B*).

Debido a su inferior calidad, los embriones C2 – tanto frescos como criopreservados – tienen una mayor tendencia a acumular sus GLs en forma de grupos, por lo que las proporciones diferenciales entre subespecies se observan mucho más marcadas que en los embriones C1 (*Figura 4 A*). En los embriones C2, los grupos de 2-3 GLs que predominan substancialmente en los embriones frescos de *B. taurus* (68 vs. 39%, $P<0.05$), aumentan en ambas subespecies después de la descongelación (*B. taurus* de 68 a 77%; *B. indicus* de 39 a 55%, $P<0.05$). Por el contrario, los grupos de 7-9 y >9 GLs que son más numerosos en embriones frescos *B. indicus* (7-9 GLs: 12 vs. 3%; >9 GLs: 18 vs. 0.48%, $P<0.05$), disminuyen después del proceso de congelación-descongelación observándose diferencias estadísticamente significativas solamente en los grupos de >9 GLs de 18 a 6% ($P<0.05$) en *B. indicus* y en *B. taurus* ni siquiera se presenta formación de grupos de gotas (*Figura 4 B-C*).

Respecto al volumen total de los grupos de GLs (suma total del volumen de cada GL que conforma el grupo), aunque sólo existen diferencias significativas en los grupos de 4-6 GLs entre *B. indicus* y *B. taurus* ($299 \mu\text{m}^3 \pm 16.09$ vs. $207 \mu\text{m}^3 \pm 17.28$, $P<0.05$) se puede identificar esta misma tendencia en los otros tipos de grupos: de 2-3 GLs: $155 \mu\text{m}^3 \pm 7.13$ vs. $146.7 \mu\text{m}^3 \pm 8.70$ (NS); de 7-9 GLs: $600 \mu\text{m}^3 \pm 57.28$ vs. $527 \mu\text{m}^3 \pm 105.6$, (NS); y de >9 GLs $813 \mu\text{m}^3 \pm 80.08$ vs. $637 \mu\text{m}^3 \pm 132$ (NS) (*Figura 3 A y C*).

Posterior al proceso de congelación-descongelación (CD), los grupos de 2-3 GLs en *B. indicus* ($155 \mu\text{m}^3 \pm 7.139$ en fresco vs. $118 \mu\text{m}^3 \pm 4.587$ post-CD, $P<0.05$) y de 4-6 GLs en *B. taurus* ($207 \mu\text{m}^3 \pm 17.28$ vs. $249 \mu\text{m}^3 \pm 11.1$, $P<0.05$) muestran un cambio de volumen estadísticamente significativo. Esta tendencia de disminución de volumen (alrededor de $37 \mu\text{m}^3$) en *B. indicus* y de incremento en *B. taurus* (alrededor de 42

μm^3) se puede observar en todos los rangos de gotas de los grupos aunque no es significativa (*Figura 3 A y C*).

La evaluación del volumen de las GLs individuales revela que las gotas de embriones frescos *B. indicus* son 1.38 veces más grandes que las de *B. taurus* ($47 \mu\text{m}^3 \pm 0.79$ vs. $34 \mu\text{m}^3 \pm 0.71$, $P < 0.05$) y que el proceso de congelación-descongelación reduce el volumen en ambos biotipos embrionarios, ocurriendo el cambio más drástico en *B. indicus* (de $47 \mu\text{m}^3 \pm 0.79$ a $21 \mu\text{m}^3 \pm 0.32$, $P < 0.05$; *B. taurus* de $34 \mu\text{m}^3 \pm 0.71$ a $28 \mu\text{m}^3 \pm 0.37$, $P < 0.05$) (*Figura 5*).

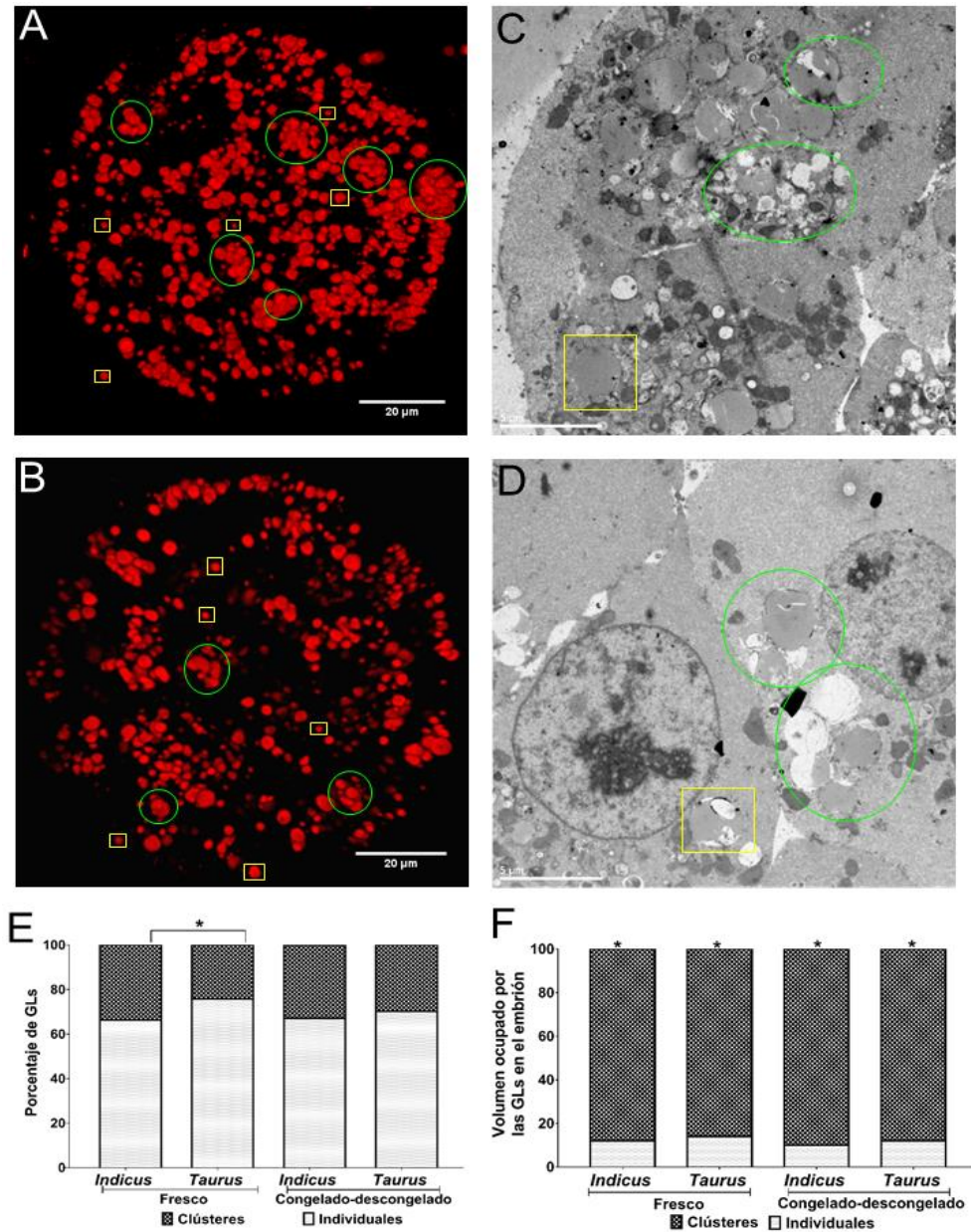


Figura 2. Organización y distribución de las GLs en el embrión. Imágenes de embriones frescos *B. indicus* y *B. taurus* con microscopía multifotónica (A y B, respectivamente) y con microscopía electrónica (C y D). En todas las imágenes se muestran gotas en forma individual (cuadrados amarillos) y en grupos (círculos verdes). El análisis cuantitativo y volumétrico que las gotas ocupan en el embrión se aprecia en las gráficas E y F. (E) Distribución de las GLs. Gráfica de barras apiladas que compara el porcentaje de gotas individuales y en grupo entre subespecies y tratamientos. El número total de GLs por embrión fue normalizado al volumen de cada mórula. (F) Volumen que las gotas ocupan en el embrión. Gráfica de barras apiladas que compara los porcentajes de volumen que las gotas individuales y en grupo ocupan en el embrión en ambas subespecies y tratamientos. El volumen de cada GL fue normalizado al volumen de cada embrión. Ambos análisis utilizaron la prueba t paramétrica no pareada. Asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$. En la gráfica F, las diferencias significativas son dentro de la misma columna. La N en cada subespecie y tratamiento fue de 6.

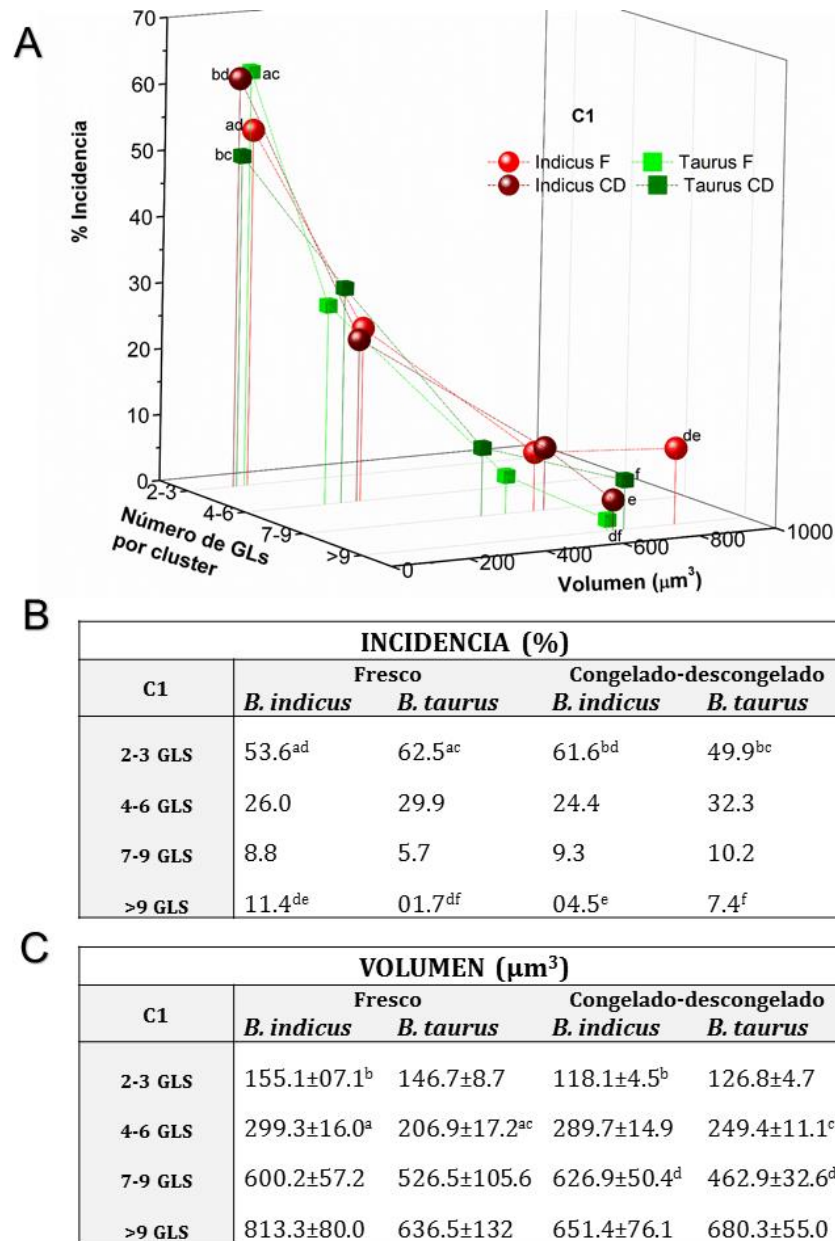


Figura 3. Comparación de las principales características de organización de los grupos de gotas entre embriones *B. indicus* y *B. taurus*. (A) La gráfica 3D muestra la relación entre la incidencia (porcentaje de cada tipo de grupo de GLs), volumen (µm³) y número de gotas que conforman cada grupo. La línea sólida indica la incidencia y volumen de los grupos de gotas, mientras que la línea punteada representa los cambios de volumen a través de los diferentes tipos de grupos. C1= embriones calidad 1, F=fresco, CD=congelado-descongelado. (B) El cuadro muestra los datos de incidencia de la gráfica y (C y D) Representan los datos de incidencia y volumen, respectivamente, de la gráfica A. Para el análisis de incidencia se utilizó la prueba t paramétrica no pareada y para el volumen la prueba ANOVA de una vía con comparación de medias por TUKEY. Mismas letras denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre la variable incidencia. La N en cada subespecie y tratamiento fue de 6.

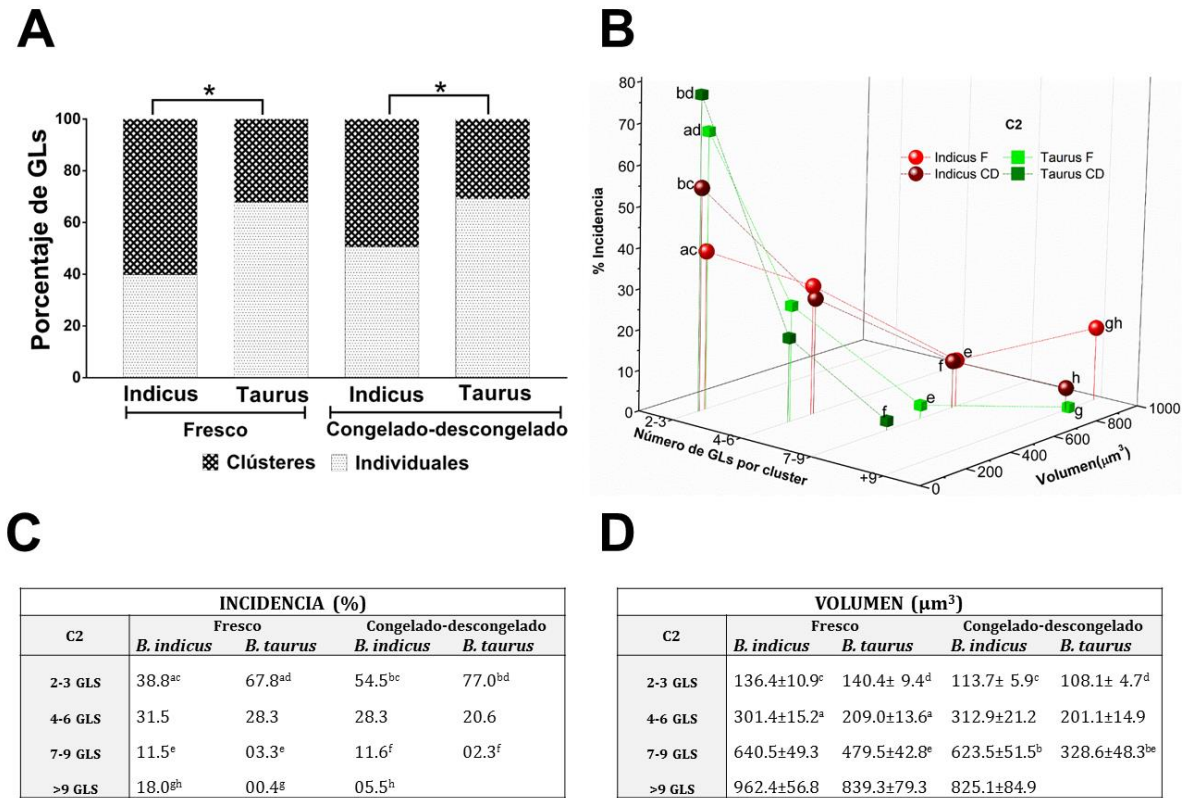


Figura 4. Distribución y comparación de las principales características de organización de los grupos de gotas de embriones C2 *B. indicus* y *B. taurus*. (A) Distribución de las GLs individuales y en grupo de embriones C2. Gráfica de barras apiladas, que compara el porcentaje de cada tipo de organización de las GLs entre subespecies y tratamientos. El número total de GLs por embrión fue normalizado al volumen de cada mórula. El análisis estadístico se realizó con la prueba t paramétrica no pareada. Asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$. (B) Comparación de las principales características de organización de los grupos de gotas entre embriones C2 *B. indicus* y *B. taurus*. La gráfica 3D muestra el comportamiento de los grupos de GLs de embriones C2 en cada subespecie antes y después de la congelación. La línea sólida indica incidencia y volumen de los grupos de GLs, y la línea punteada representa los cambios de volumen a través de los diferentes tipos de grupos. (C y D) Representan los datos de incidencia y volumen, respectivamente de la gráfica B. Para el análisis de incidencia se utilizó la prueba t paramétrica no pareada, y para el volumen la prueba ANOVA de una vía con comparación de medias por TUKEY. Mismas letras denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre la variable incidencia. La N en cada subespecie y tratamiento fue de 3. C2= embriones calidad 2. F=fresco, CD=congelado-descongelado.

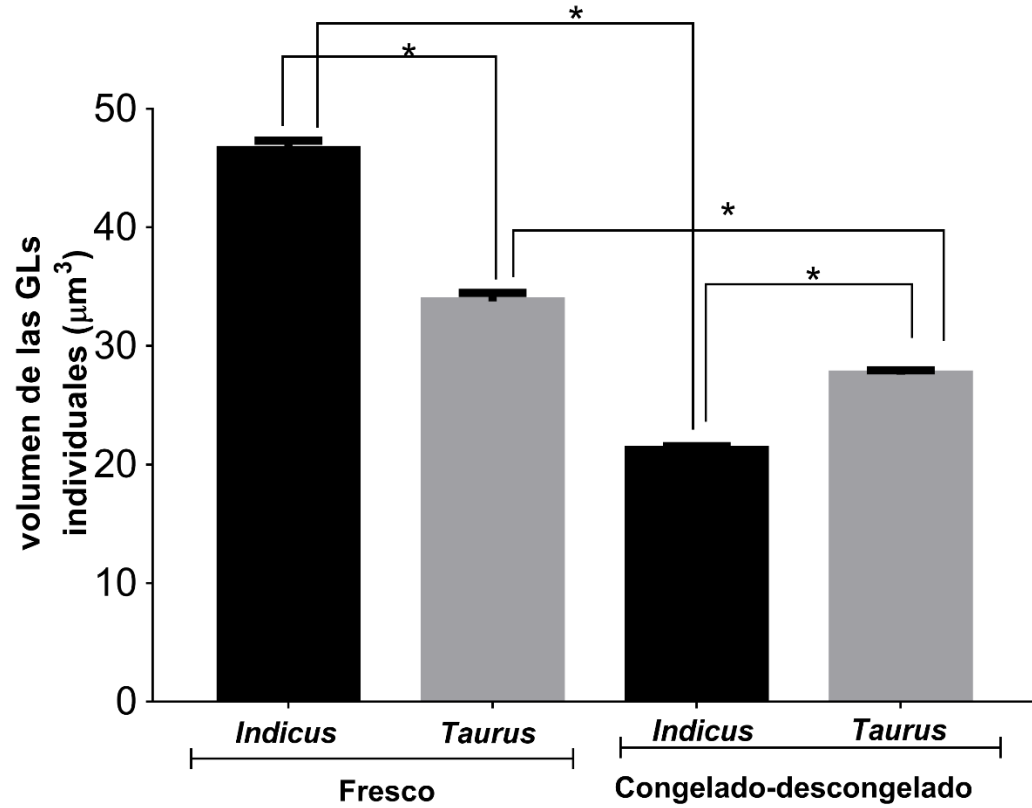


Figura 5. Comparación del volumen de las GLs individuales. La gráfica de barras muestra el volumen de las GLs individuales entre embriones *B. indicus* y *B. taurus* antes y después de la criopreservación. Para el análisis estadístico del volumen se ocupó la prueba ANOVA de una vía con comparación de medias por TUKEY. Las barras denotan media \pm SEM. Asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$. La N en cada subespecie y tratamiento fue de 6.

4.2 Morfología y composición (saturada o insaturada) de las gotas lipídicas

El análisis de las GLs por MET nos permitió observar dos tipos de morfología diferentes, a los que denominamos craquelada y homogénea (*Figura 6. A-B*). Las gotas craqueladas presentan “grietas” (espacios blancos) sobre su superficie y en algunas incluso pierden su forma. Las gotas homogéneas tienen una superficie totalmente “lisa”. Los dos tipos morfológicos fueron identificados en ambas subespecies, tanto en embriones frescos como criopreservados (*Figura 6 C-F*).

En embriones frescos las proporciones entre gotas craqueladas (33% en *B. indicus* vs. 35% en *B. taurus*, *NS*) y homogéneas (67% en *B. indicus* vs. 65% *B. taurus*, *NS*) no varían de una subespecie a otra. Sin embargo, después del proceso de congelación-descongelación el porcentaje de gotas craqueladas aumenta significativamente en *B. indicus* (de 33 a 62%, $P < 0.05$) pero no en *B. taurus* (de 35 a 34%, *NS*) (*Figura 6 G*).

Los resultados del análisis de composición de las GLs indican diferencias entre ambas subespecies. La electro densidad relativa de las gotas en embriones *B. indicus* es significativamente mayor que la de las gotas en *B. taurus* (24 ± 1.34 au vs. 14 ± 0.91 au, respectivamente, $P < 0.05$). En una escala de grises, los valores extremos van de 250-0 au, donde el 250 representa baja electro densidad o bien ácidos grasos saturados mientras que el cero denota alta electro densidad relativa o ácidos grasos insaturados. Por lo tanto, al poseer las GLs de los embriones *B. indicus* un valor diferencialmente superior al de las gotas *B. taurus*, la composición de los *B. indicus* corresponde a los ácidos grasos saturados, mientras que el de *B. taurus* a ácidos grasos insaturados. Después del proceso de congelación-descongelación se detectó un aumento de electro densidad relativa en ambas subespecies (*B. indicus* 33 au ± 2.582 vs. *B. taurus* 17 au ± 1.27 , $P < 0.05$) inclinándose hacia valores de ácidos grasos saturados (*Figura 6 H*).

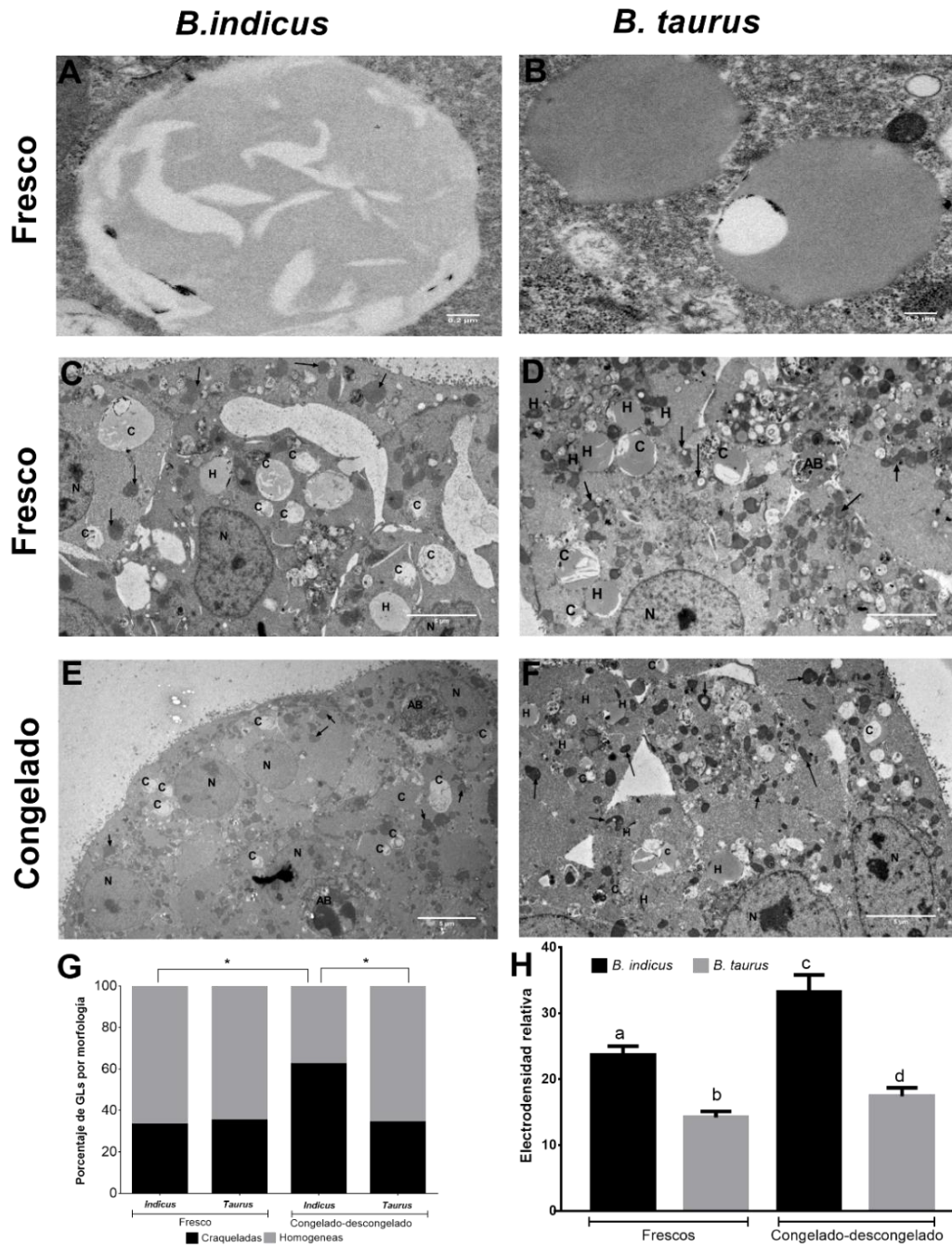


Figura 6. Morfología y composición de las GLs. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión. (A) Gota craquelada (X5000); (B) gota homogénea (X5000); (C) *B. indicus* fresco (X600); (D) *B. taurus* fresco (X600); (E) *B. indicus* congelado-descongelado (X500); (F) *B. taurus* congelado-descongelado (X600); N= núcleo, flecha= mitocondria, C= gota craquelada, H= gota homogénea, AB= cuerpos apoptóticos. (G) Efecto de la criopreservación sobre la morfología. Gráfica de barras apiladas que muestra la comparación entre los porcentajes de cada tipo de morfología en embriones frescos versus congelado-descongelado en ambas subespecies. Los asteriscos denotan diferencias significativas de $P < 0.05$. (H) Composición lipídica de gotas *B. indicus* y *B. taurus* donde los valores cercanos al 0 au denotan ácidos grasos insaturados y valores inclinados a 254 au ácidos grasos saturados. Ambos análisis se realizaron mediante la prueba t paramétrica no pareada. Las barras denotan media \pm SEM. Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$. La N en cada subespecie y tratamiento fue de 5 embriones.

4.3 Especies reactivas de oxígeno

El incremento desbalanceado de las EROs en embriones daña proteínas, lípidos (peroxidación lipídica) y ácidos nucleicos (apoptosis) ocasionando la pérdida de su capacidad de implantación. Debido a esto la medición comparativa de EROs entre embriones *B. indicus* y *B. taurus* resulta trascendental. Empleando el método descrito, encontramos que los embriones *B. indicus* tienen niveles significativamente mayores de EROs que los embriones *B. taurus*, tanto en fresco (14.32 ± 1.41 auf vs. 8.07 ± 1.15 auf, $P < 0.05$) como después del proceso de congelación (20.91 ± 1.21 auf vs. 14.39 ± 0.58 auf, $P > 0.05$).

Cabe destacar que a el proceso de congelación-descongelación afectó tanto a *B. indicus* como a *B. taurus* viéndose un incremento promedio de 6.5 y 6.3 auf, respectivamente ([Figura 7 A-E](#)). Antes de la congelación los embriones *B. indicus* tenían un nivel inicial de EROs mayor que *B. taurus* y esta tendencia se mantiene después de la congelación, teniendo *B. indicus* 1.45 auf más que los embriones *B. taurus*.

4.4 Peroxidación lipídica y Número de núcleos positivos a TUNEL

Para determinar el daño oxidativo se emplearon dos aproximaciones: la cuantificación de la peroxidación lipídica (con un kit) y la técnica de TUNEL, que nos permite cuantificar la cantidad de núcleos apoptóticos. Contrario a lo que se esperaba, lo embriones frescos *B. indicus* tienen menos PL en comparación con los *B. taurus* (2.467 auf ± 0.1487 vs. 4.201 auf ± 0.5182 , $P < 0.05$), pero post-descongelación tienen 4.34 veces más (51.45 ± 5.523 auf vs. 11.85 ± 2.887 auf, $P < 0.05$). Así, la diferencia de peroxidación lipídica entre la condición de frescos vs. congelados es significativamente mayor *B. indicus* ([Figura 8. A-E](#)).

El número de núcleos positivos a Túnel es significativamente mayor en los embriones *B. indicus* en comparación con los *B. taurus* tanto en fresco (8.286 ± 0.8081 vs. 1 ± 0.5774 , $P < 0.05$) como descongelados (9.75 ± 1.031 vs. 5.5 ± 1.15 , $P < 0.05$). Obsérvese que el efecto congelación-descongelación aumenta el número de núcleos apoptóticos en ambos biotipos embrionarios (de 8.286 ± 0.8081 a 10.71 ± 0.4206 en *B. indicus*, $P < 0.05$; y de 1 ± 0.5774 a 5.5 ± 1.15 en *B. taurus*, $P < 0.05$) (Figura 9. A-E).

4.5 Correlación del volumen y número de grupos de gotas con EROs y PL

Al correlacionar el volumen de las GLs y el número de grupos de GLs con EROs se encontró una r positiva significativa de 0.73, lo cual indica que a mayor volumen y cantidad de grupos mayor cantidad de EROs. Por otro lado, con respecto a la PL se encontró una r negativa significativa de -0.60 (con respecto al volumen de las GLs) y -0.78 (con respecto al número de grupos), lo cual indica que a mayor volumen de las GLs y número de grupos de gotas menor PL.

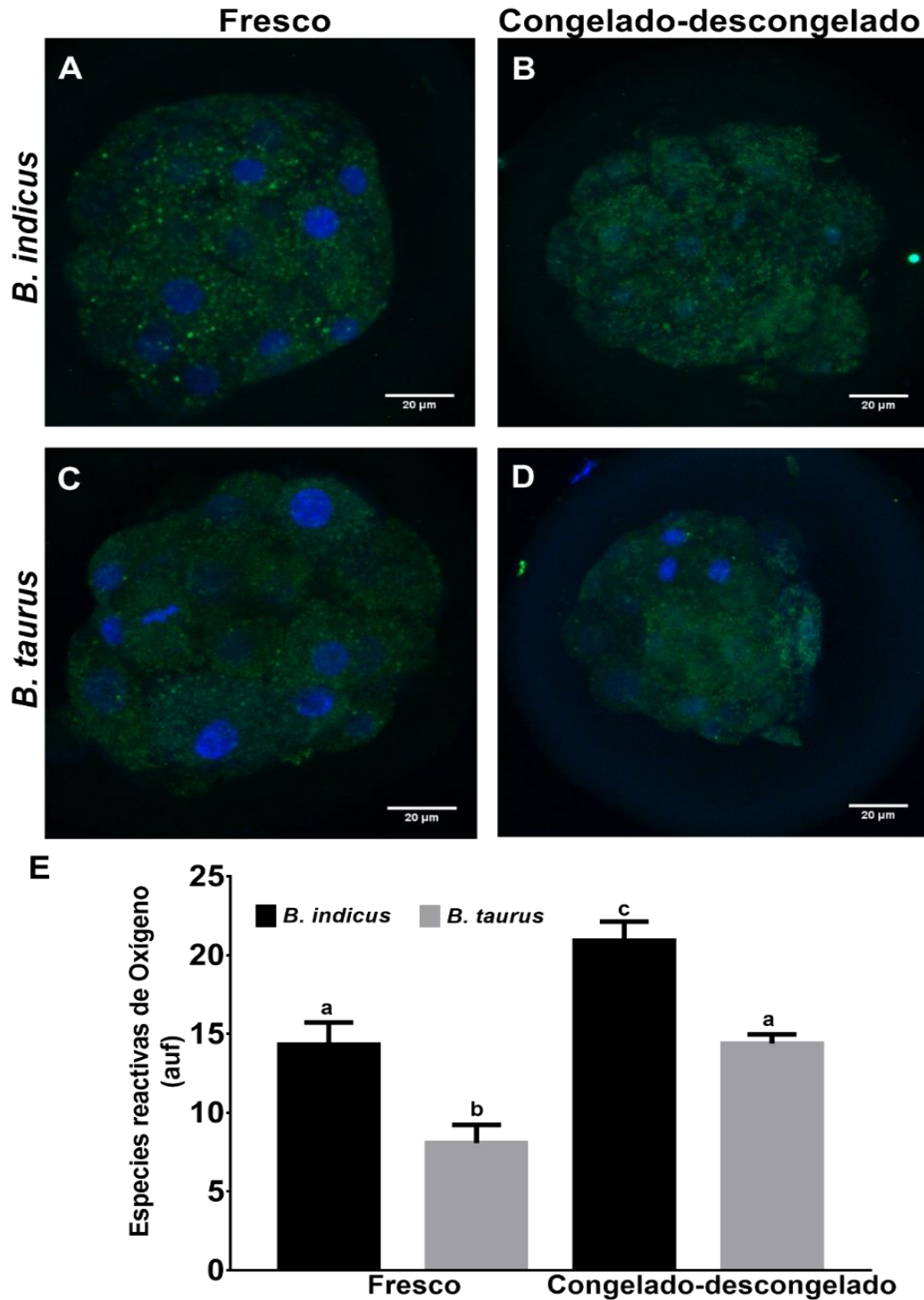


Figura 7. Comparación de niveles de especies reactivas de oxígeno entre embriones *B. indicus* y *B. taurus* antes y después de la congelación. (A-D) Imágenes de microscopía confocal, en verde se muestra la oxidación de un sensor sensible a EROs y en azul los núcleos. (E) Representación gráfica de los niveles de EROs. Las barras denotan media \pm SEM. En el análisis estadístico se utilizó la prueba t paramétrica no pareada. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre columnas $P < 0.05$. La N para embriones *B. taurus* congelados-descongelados es de 7. Para el resto es de 6.

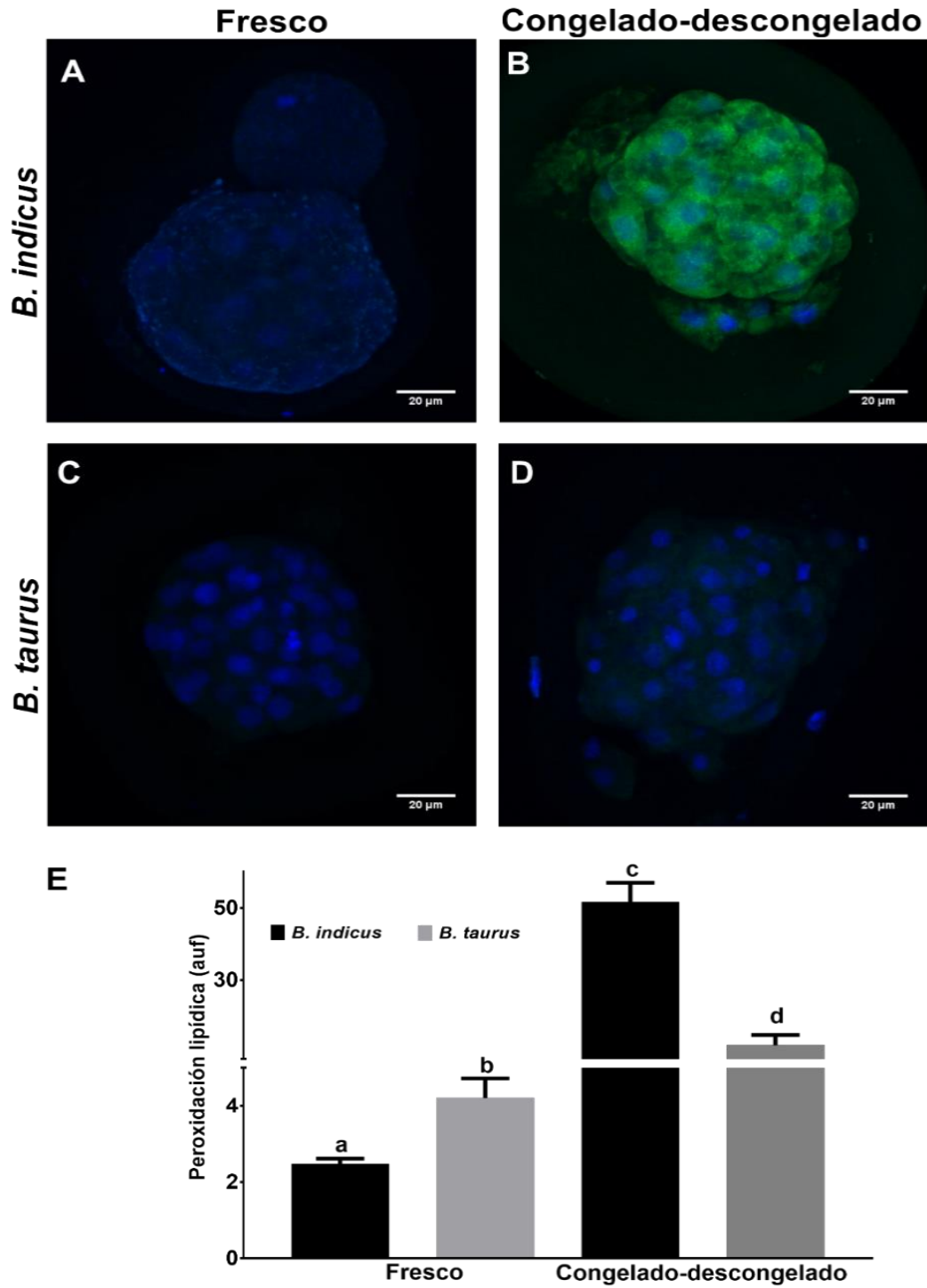


Figura 8. Comparación de niveles de peroxidación lipídica entre embriones *B. indicus* y *B. taurus* antes y después de la congelación. (A-D) Imágenes de microscopía confocal, en verde peroxidación lipídica y en azul los núcleos. (E) Representación gráfica de los niveles de peroxidación lipídica. Las barras denotan media \pm SEM. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre columnas $P < 0.05$. Prueba estadística t no pareada. La N en *B. indicus* fresco es de 6, en *B. taurus* frescos y *B. indicus* congelado-descongelado de 8 y *B. taurus* congelado-descongelado de 7.

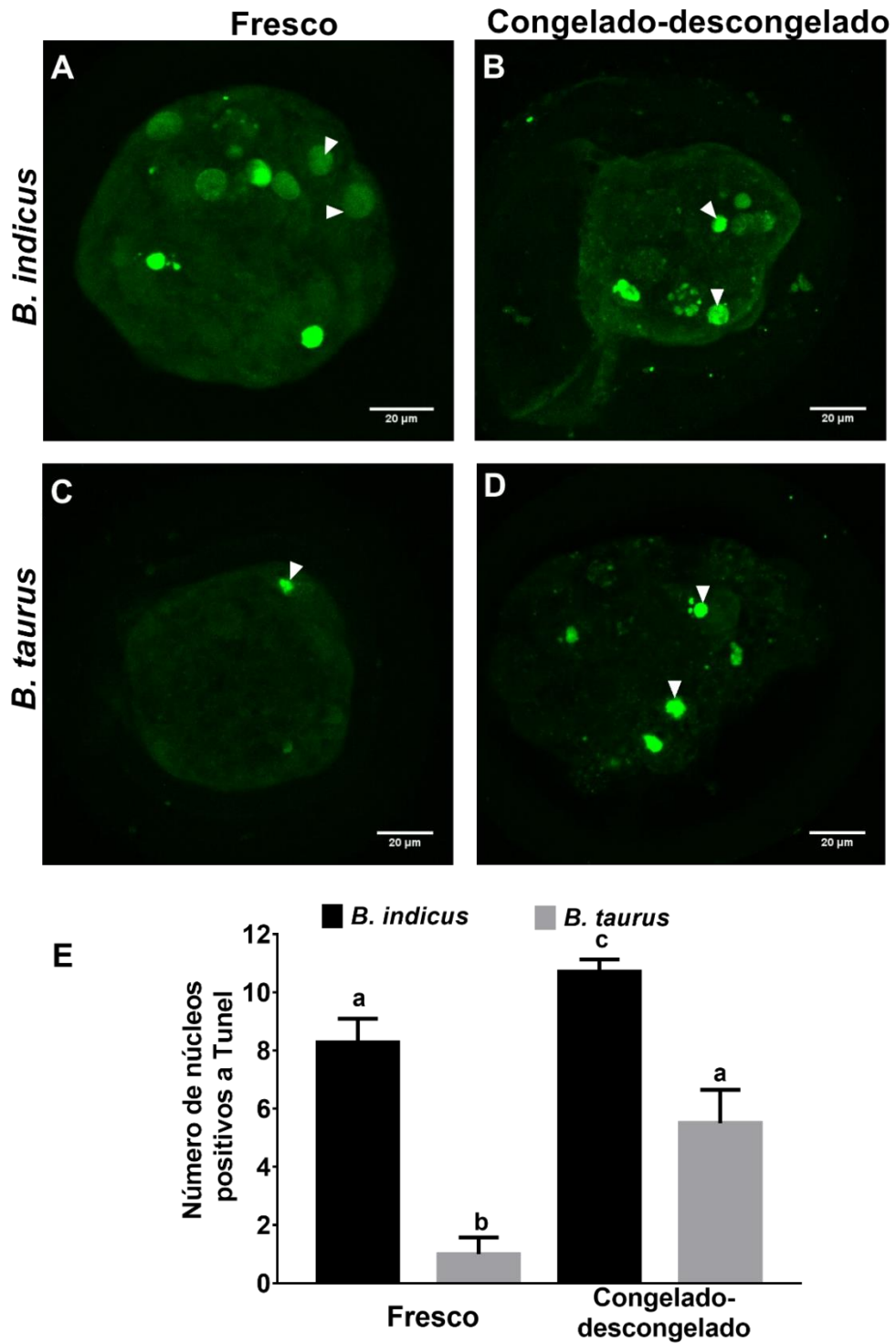


Figura 9. Núcleos positivos a la prueba de TUNEL entre embriones *B. indicus* y *B. taurus* antes y después de la congelación. (A-D) Imágenes de microscopía confocal, las cabezas de flecha ejemplifican los núcleos positivos a TUNEL. (E) Representación gráfica del número de núcleos apoptóticos. Las barras denotan media \pm SEM. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre columnas $P < 0.05$. Prueba estadística t no pareada. La N para *B. taurus* congelado-descongelado es de 8, el resto presenta una N de 7 embriones.

Discusión

5.1 Gotas lipídicas

En este trabajo el empleo de microscopía multifotónica y el análisis *ad hoc* de imágenes nos permitió realizar una caracterización detallada de las propiedades de las gotas lipídicas y establecer diferencias importantes entre los embriones de *B. indicus* y *B. taurus* antes y después del proceso de congelación. Nuestros resultados demuestran que las GLs de *B. indicus* y *B. taurus* son diferentes en su organización (individual y en grupos), proporción, volumen y composición. A pesar de que en ambos biotipos embrionarios las GLs individuales superan en número a las gotas en grupos, el mayor volumen embrionario (86%) lo ocupan los grupos de gotas. Después del proceso de congelación-descongelación las gotas en grupo experimentan cambios de proporción, tamaño, morfología y composición de forma inversa entre subespecies. Dadas estas observaciones se puede inferir que la baja crio-viabilidad que caracteriza a los embriones *B. indicus* se debe a las características de las gotas en grupos.

Existen diversos estudios contradictorios sobre la cantidad total de GLs en *B. indicus* y *B. taurus*. Las diferencias podrían deberse a que los trabajos, realizados en ovocitos de ambas subespecies, emplean técnicas diferentes. Ballard y colaboradores [56](#) concluyeron que en los ovocitos de *B. indicus* hay un alto contenido lipídico empleando técnicas de densidad de flotación y tinción lipofílica por microscopía epifluorescente. Por el contrario, Visintin y colaboradores [58](#) concluyeron que los embriones de *B. taurus* tienen un mayor número y tamaño de GLs empleando microscopía electrónica de transmisión. Ambos tipos de microscopía tienen limitantes ópticas que podrían interferir en los resultados. A pesar de que la microscopía electrónica de transmisión permite observar estructuras con una resolución de entre 0.14 y 0.23 nm, las gotas lipídicas pequeñas entre 70 y 100 nm de diámetro son normalmente difíciles de identificar debido a la ausencia de membranas discernibles y contenido electro denso [84](#). Además, el análisis de sólo un segmento del embrión - e incluso de las células - no permite obtener una cuantificación total del embrión. La

microscopía de epifluorescencia tampoco da información detallada de todo el embrión y es que al tener una resolución mínima en el plano Z, difícilmente se pueden distinguir dos gotas juntas (como es el caso de los grupos de GLs aquí descritos). Otros trabajos han empleado técnicas de tinción como el sudan negro, que emplea alcohol durante el procesamiento, lo cual modifica la organización de las GLs [45,132](#). En cambio, el uso de microscopía multifotónica y el empleo del marcador rojo de Nilo nos permiten obtener información de todo el embrión, mejorando la resolución en los planos X-Y y Z casi hasta 100 nm, permitiéndonos diferenciar gotas individuales aun cuando estén una junto a la otra, como es el caso de los grupos de gotas.

Si bien nuestros resultados no muestran una diferencia estadística en la proporción de GLs entre subespecies, sí exponen diferencias claras en cuanto a tamaño y organización; parámetros que, de acuerdo con algunos autores, confieren ventajas y desventajas celulares. Por ejemplo, se ha observado que una gota lipídica chica incrementa la viabilidad post-descongelación [19](#), ya que un aumento de tamaño, como el que experimentan las gotas de los embriones bovinos *in vitro*, produce baja sobrevivencia y bajos porcentajes de eclosión post-descongelación [17,19](#), que pueden ser revertidos tras su reducción de volumen mediante la inducción de lipólisis [85](#). Así mismo, una gota chica desarrolla menos hidroperóxidos que una grande [21](#). Estudios computacionales sugieren que, debido a que los triglicéridos de las GLs son termodinámicamente inestables, la mayor libertad de movimiento en gotas grandes facilita la transferencia de los triglicéridos del núcleo hacia la monocapa, predisponiéndolos a su oxidación [133](#). Esto ocasiona que tener gotas grandes promueva mayores niveles de peroxidación lipídica. Con respecto a la organización de las gotas, la formación de gotas en grupos está vinculada a una acumulación excesiva de lípidos [134](#). Dicha acumulación es una respuesta al estrés oxidativo [135](#), por lo que el tener una gran cantidad de GLs en grupos es indicativo de altos niveles de EROs [54](#).

De acuerdo a nuestras observaciones, los embriones *B. indicus* son de menor calidad criogénica que los embriones *B. taurus* dado que tienen tanto gotas individuales ($47\mu\text{m}^3$ vs. $34\mu\text{m}^3$) como en grupos más grandes ($299\mu\text{m}^3$ vs. $207\mu\text{m}^3$). Encontramos que el volumen de las gotas individuales en ambos biotipos embrionarios disminuye después del proceso de congelación-descongelación. Como se discute más adelante, esta misma reducción de tamaño lipídico se observa en los grupos de gotas de *B. indicus* pero no en los de *B. taurus*, en los que incluso se puede apreciar un aumento de volumen. Hemos relacionado los cambios de volumen con procesos de fragmentación y fusión de las GLs.

Una de las diferencias principales entre los embriones de una y otra subespecie es la proporción de los grupos de gotas post-descongelación. Los embriones C1 de *B. indicus* tienen 10% más grupos que los de *B. taurus* y en los C2 la diferencia es aún mayor (28%). Los cambios en la cantidad de grupos de gotas marcan un patrón inverso de “reducción y “aumento” en cada subespecie. En *B. taurus* los grupos de 2-3 GLs se juntan, incrementando así los grupos de >9 GLs, mientras que en *B. indicus* los grupos de >9 GLs se fragmentan dando pie a un aumento de grupos de 2-3 GLs, estas reacciones inversas sugieren dos procesos diferentes: coalescencia y fragmentación, respectivamente.

En embriones de mosca (Gall fly, *Eurosta solidaginis*) el evento de coalescencia ha sido descrito como una respuesta a la deshidratación durante la congelación [136,137](#), y un mecanismo mediante el cual la gota recupera su estabilidad termodinámica [138,139](#). Cabe destacar que dicho proceso no es indicativo de daño, ya que las gotas de larvas de mosca que experimentan este efecto, sobreviven y completan su desarrollo llegando hasta su forma adulta [136,137](#).

Se sabe que la estabilidad de las gotas depende de surfactantes como fosfolípidos y proteínas de membrana; que al perderlos se promueve la fusión de las gotas [138,140,141](#).

El tipo de surfactantes (por ejemplo: fosfatidilinositol, diacilglicerol o fosfatidilcolina) varían de acuerdo al tamaño [84.142.143](#); por lo que mientras más chica sea una gota, mayor será la proporción necesitada de fosfatidilcolina y proteínas para mantener la estabilidad de las gotas [84.138](#). Estudios sobre perfiles lipídicos de membrana hechos en embriones bovinos de diferentes razas (incluyendo *B. taurus* y *B. Indicus*) demuestran que la fosfatidilcolina varía en su longitud de cadena de carbohidratos y nivel de saturación entre los embriones *B. indicus* y *B. taurus* [45.144](#). Esta diferencia aunada a los cambios de coalescencia y fragmentación que experimentan los grupos post-descongelación nos hace pensar que la composición de fosfolípidos de las gotas de *B. indicus* y *B. taurus* es diferente, lo cual explicaría la estabilidad de las gotas post-descongelación en los embriones *B. taurus*.

La diferencia en composición de las GLs entre *B. indicus* y *B. taurus* podrían explicar el evento de fragmentación que es el observado en los grupos de los embriones *B. indicus*. Este proceso involucra dispersión de los grupos de gotas en múltiples grupos pequeños [145](#) y debido a que el número de ligaduras de los ácidos grasos modifica el punto de congelación o solidificación [23](#), bajo el esquema de crio-preservación, los ácidos grasos saturados al solidificarse antes que los insaturados [23.80.81](#), contraen la gota provocando su desestabilización [139](#) y salida del contenido al citoplasma [138](#). Aunado a esto, en condiciones de cultivo, se ha visto que el proceso de fragmentación, es considerado producto de la lipólisis [146](#). Sin embargo, dada la naturaleza de nuestros experimentos no podemos aseverar que el proceso de lipólisis se haya presentado en los embriones aquí analizados; pero sí podemos hipotetizar que este evento haya ocurrido, debido a que hay evidencia de actividad por parte de las fosfolipasas durante la congelación [86](#), las cuales catalizan la hidrólisis de triglicéridos a diacilglicerol, el primer paso en la reacción lipolítica [147](#).

Respecto a las diferencias de composición, nuestros resultados confirman que las gotas lipídicas de *B. indicus* son de origen saturado y que las de *B. taurus* son de origen

insaturado. Estos resultados concuerdan con los de Ordoñez-Leon y colaboradores [148](#) que usaron el mismo método de evaluación en embriones *in vitro*. De igual manera, Sudano y colaboradores [45](#) reportaron que los fosfolípidos de membrana de *B. indicus* están constituidos por ácido palmítico (16:0) y esteárico (18:0) y los de *B. taurus* por ácido linoléico (18:2 $\Delta^9, 12$). Esta mayor proporción de ácidos grasos saturados en *B. indicus* explica el hecho de que post-congelación encontráramos mayoritariamente gotas craqueladas. El cambio observado en la composición de las gotas tras la descongelación de ácidos grasos insaturados a saturados concuerda con reportes presentados en semen, donde los ácidos grasos polinsaturados disminuyen post-congelación. Esto posiblemente se debe a la peroxidación lipídica [90,149](#), que inicia en las dobles ligaduras de los ácidos grasos polinsaturados [102](#).

Los dos tipos morfológicos de GLs que hemos descrito en este trabajo, homogéneas y craqueladas, se pueden observar en distintos artículos que emplean diferentes métodos de producción embrionaria y de especies [15,47,148,150-153](#). Las gotas aquí denominadas craqueladas presentan grietas en su superficie, e incluso algunas llegan a perder su integridad, lo cual es indicativo de una fracturación de la membrana. La apariencia craquelada podría deberse a la compresión de las proteínas sobre la superficie [138](#) y a la separación de los diferentes triglicéridos y ésteres de colesterol que coexisten en las gotas [154](#).

En ovocitos de cerdo se ha descrito que las gotas craqueladas se observan después del proceso de congelación-descongelación [152](#). En el presente trabajo reportamos que si bien las gotas craqueladas se observan en embriones frescos, su proporción aumenta significativamente en embriones *B. Indicus* post-congelación. Hemos asociado a este tipo morfológico de GLs como un posible detonador del proceso de fragmentación que experimentan los grupos de GLs de *B. indicus* post-descongelación.

5.2 Especies reactivas de oxígeno, peroxidación lipídica y apoptosis

Las diferentes concentraciones de radicales libres encontradas entre embriones frescos de *B. indicus* y *B. taurus* indican diferencias intrínsecas de subespecie y, más aún, explican la proporción de GLs acumuladas en grupos. Como se discutió anteriormente la alta cantidad de GLs se asocia con estrés oxidativo, el cual se desencadena por la alta cantidad de EROs [29](#). Como los embriones *B. indicus* poseen una alta cantidad de EROs se esperaría también una mayor cantidad de gotas en grupo, lo cual corresponde a lo encontrado en este estudio.

Después de que los embriones de ambos biotipos son descongelados, existe un incremento significativamente importante en el número de EROs que podría deberse al aumento abrupto de oxígeno causado por la re-oxigenación [98,155](#). El oxígeno es una molécula capaz de atravesar membranas; además es altamente reactiva debido a que tiene dos electrones desapareados, lo cual ocasiona que se reduzca [91](#) generando diversos radicales libres como: anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Los radicales dañan lípidos, proteínas y ácidos nucleicos [91-93](#) y desencadenan eventos de peroxidación lipídica y muerte celular.

Tomando en cuenta que los embriones frescos de *B. indicus* presentan una mayor cantidad de EROs que los de *B. taurus* podríamos pensar que éstos tendrían mayores concentraciones de peroxidación lipídica que los *B. taurus*. Sin embargo los embriones *B. indicus* tienen 1.7 veces menos peroxidación lipídica que los embriones *B. taurus*. Una posible explicación podría deberse al gran número de gotas en grupo en los embriones frescos de *B. indicus*. Bailey y colaboradores [55](#) señalan que las GLs funcionan como antioxidantes al secuestrar ácidos grasos polinsaturados, alejándolos de la membrana y evitando su oxidación.

Otro factor que ayuda a controlar la peroxidación lipídica en los embriones *B. Indicus* es, presumiblemente, su composición lipídica. La peroxidación lipídica inicia cuando se extrae un átomo de hidrógeno de un carbono metileno (CH₂) de la cadena de ácidos grasos, lo cual sucede con mayor facilidad en las dobles ligaduras de los ácidos grasos polinsaturados que en los monoinsaturados y saturados [102](#). Como se había señalado anteriormente, los embriones *B. indicus* presentan una composición de ácidos grasos saturados y los *B. taurus* de insaturados, por lo que mayores niveles de peroxidación lipídica en los embriones de la segunda subespecie son de esperarse.

A pesar de ello, tras la descongelación de los embriones, *B. indicus* tiene 4.34 veces más peroxidación que *B. taurus*, lo cual expone un incremento diferencialmente grande de peroxidación lipídica entre ambas. Es posible que este efecto se deba al tamaño de las GLs y a la fragmentación que ocurre en los embriones *B. indicus*. Como se mencionó anteriormente, una GL grande genera más hidroperóxidos que una gota chica [21](#). Esto posiblemente se deba a que los triglicéridos que están en el núcleo de las gotas son termodinámicamente inestables [133](#) y tras haber sido sujetos a un proceso térmico de criopreservación, tienden a moverse hacia la monocapa de la gota, predisponiéndose a su oxidación. Además la fragmentación de las gotas sugiere el derrame del contenido de la gota al citoplasma, de forma que el sustrato disponible para que se expanda la peroxidación lipídica aumenta. Así pues, la criopreservación de los embriones *B. indicus* acrecienta la peroxidación lipídica, que a su vez causa un aumento de la viscosidad de la membrana, rompe el potencial de membrana e incrementa el flip-flop de la fosfatidilserina hacia la membrana exterior, señalizándose como un estímulo a la apoptosis [101](#).

Por otra parte sugerimos que el alto número de núcleos positivos a TUNEL presentes en los embriones *B. indicus* en comparación con los *B. taurus*, tanto en fresco como criopreservados, se debe a la alta cantidad de EROs que exhiben los embriones de la primera subespecie. Yang y colaboradores [109](#) concluyeron que existe una relación

directa entre los niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el porcentaje de apoptosis en embriones humanos. Por lo que los embriones *B. indicus* al tener una mayor cantidad EROs tendrán también un mayor grado de muerte celular.

Al evaluar el daño apoptótico que la criopreservación induce sobre embriones, Márquez-Alvarado y colaboradores [115](#) encontraron resultados similares a los nuestros en el ganado *B. Indicus*. Los embriones frescos de su estudio presentaron un promedio de 7.09 núcleos positivos a TUNEL y los congelados de 11.7. En nuestros experimentos encontramos un promedio de 8.28 núcleos positivos a TUNEL para embriones frescos y 10.71 para embriones congelados, quedando en claro que el proceso de congelación-descongelación incrementa los índices de muerte celular. El número de núcleos apoptóticos en cada subespecie es intrínsecamente distinto; en la comparación de embriones *B. indicus* versus *B. taurus* se ha encontrado que los embriones de la segunda subespecie sobre-expresan el gen DAD1 indicando la prevención de apoptosis [66](#).

Las diferencias entre las GLs de los embriones *B. indicus* y *B. taurus* nos dan la pauta para proponer que la baja crio-viabilidad de los embriones *B. indicus* es causada por el proceso de fragmentación que experimentan sus gotas. *B. indicus* tiene una composición importante de ácidos grasos saturados en sus GLs mientras que *B. taurus* de ácidos grasos insaturados, por lo que los primeros solidifican más rápidamente. Dicha fragmentación podría ser el detonante de la craquelación que en consecuencia, podría derramar contenido al citoplasma aumentando el sustrato para las EROs suscitando la peroxidación lipídica. Más aún, la desestabilización termodinámica de las gotas grandes de *B. indicus* ocasionaría la transferencia de triglicéridos del núcleo de las gotas a su monocapa, predisponiéndolos a su oxidación. Al mismo tiempo, los elevados niveles de EROs favorecen al daño oxidativo del ADN, repercutiendo en muerte celular y por tanto en pérdida de la viabilidad embrionaria.

Por el contrario las GLs de los embriones *B. taurus* tardan más tiempo en solidificarse debido a la naturaleza de sus ácidos grasos insaturados. Al estar sujetas a cambios termodinámicos las gotas de *B. taurus* coalescen, evitando derramamiento de su contenido al citoplasma. Diversos autores han mostrado, en sistemas *in vivo* e *in vitro*, que la adición de ácidos grasos insaturados mejora la resistencia al enfriamiento [20.22](#) y que la inducción de la lipólisis incrementa la crio-viabilidad embrionaria [85](#). Creemos que la adición experimental de ácidos grasos insaturados podría conferir a las gotas de *B. indicus* elasticidad favoreciendo la coalescencia de las gotas durante el proceso de congelación-descongelación. Y además, la promoción de la lipólisis antes de la congelación favorecería una reducción del tamaño de las gotas lo cual tendría una serie de consecuencias como: disminuir la transferencia de los triglicéridos del núcleo de la gota a la monocapa, evitar la peroxidación lipídica e incrementar los porcentajes de preñez sin restarle practicidad a la transferencia embrionaria directa.

En conclusión, los embriones de *B. indicus* y *B. taurus* difieren en la organización, composición, número y tamaño de GLs en grupo; así como los niveles de especies reactivas de oxígeno. Estas diferencias pueden afectar directamente la sobrevivencia y los porcentajes de gestación en *B. indicus* después del proceso de congelación-descongelación. Los resultados aquí expuestos nos permiten avanzar en la comprensión y planteamiento de alternativas de congelación embrionaria que nos permitan aumentar los índices de gestación de embriones *B. indicus*.

Referencias

- [1.](#) Loftus, R. T., MacHugh, D. E., Bradley, D. G., Sharp, P. M. & Cunningham, P. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 2757–2761 (1994).
- [2.](#) Hiendleder, S., Zakhartchenko, V. & Wolf, E. Mitochondria and the success of somatic cell nuclear transfer cloning: from nuclear–mitochondrial interactions to mitochondrial complementation and mitochondrial DNA recombination. *Reprod. Fertil. Dev.* **17**, 69–83 (2005).
- [3.](#) Hiendleder, S., Lewalski, H. & Janke, A. Complete mitochondrial genomes of *Bos taurus* and *Bos indicus* provide new insights into intra-species variation, taxonomy and domestication. *Cytogenet. Genome Res.* **120**, 150–156 (2008).
- [4.](#) Baruselli, P. S. *et al.* Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. *Reprod. Fertil. Dev.* **22**, 67–74 (2010).
- [5.](#) Mapletoft, R. J. History and perspectives on bovine embryo transfer. *Anim. Reprod.* **10**, 168–173 (2013).
- [6.](#) Phillips, P. E. & Jahnke, M. M. Embryo Transfer (Techniques, Donors, and Recipients). *Vet. Clin. Food Anim. Pract.* **32**, 365–385 (2016).
- [7.](#) Hasler, J. F. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* **56**, 1401–1415 (2001).
- [8.](#) Alarcón, M. A., Galina, C. S., Corro, M. D. & Asprón, M. A. Embryo transfer, a useful technique to be applied in small community farms? *Trop. Anim. Health Prod.* **42**, 1135–1141 (2010).
- [9.](#) Barati, F. *et al.* Pregnancy rates of frozen embryos recovered during winter and summer in Sistani cows. *Iran. J. Vet. Res.* **8**, 151–154 (2007).
- [10.](#) Montiel, F., Galina, C., Rubio, I. & Corro, M. Factors affecting pregnancy rate of embryo transfer in *Bos indicus* and *Bos taurus/Bos indicus* cows. *J. Appl. Anim. Res.* **29**, 149–152 (2006).
- [11.](#) Pontes, J. H. F. *et al.* Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* **71**, 690–697 (2009).
- [12.](#) Rao, M. M., Umamahesh, Y. & Rao, K. B. Effect of breed or embryo source on pregnancy rate of cryopreserved bovine embryos. *Indian Vet. J.* **87**, 601–602 (2010).
- [13.](#) Aguilar, M. M. *et al.* Comparison of stereoscopy, light microscopy and ultrastructural methods for evaluation of bovine embryos. *Reprod. Domest. Anim.* **37**, 341–346 (2002).
- [14.](#) López-Damián, E. P., Galina, C. S., Merchant, H., Cedillo-Peláez, C. & Aspron, M. Assessment of *Bos taurus* embryos comparing stereoscopic microscopy and transmission electron microscopy. *J. Cell Anim. Biol.* **2**, 72–78 (2008).
- [15.](#) Abe, H., Matsuzaki, S. & Hoshi, H. Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. *Theriogenology*

- 57, 1273–1283 (2002).
- [16.](#) Hill, B. . & Kuehner, L. . Bovine donor blood cholesterol, embryo colour and embryo freezability. in *Theriogenology* 168 (1998).
 - [17.](#) Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T. & Hoshi, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol. Reprod. Dev.* **61**, 57–66 (2002).
 - [18.](#) Nagashima, H., Kashiwazaki, N., Ashman, R. J., Grupen, C. G. & Nottle, M. B. Cryopreservation of porcine embryos. *Nature.* **374**, 416 (1995).
 - [19.](#) Li, R.-F., Hosoe, M., Shioya, Y. & Bou, S. The preliminary research on freezing viabilities of bovine in vitro fertilized embryos. *Sci. Agric. Sin.* **35**, 1125–1129 (in Chinese) (2002).
 - [20.](#) Zeron, Y., Sklan, D. & Arav, A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **61**, 271–278 (2002).
 - [21.](#) Nakaya, K., Ushio, H., Matsuwaka, S., Shimizu, M. & Ohshima, T. Effect of droplet size on the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Lipids* **40**, 501–507 (2005).
 - [22.](#) Aardema, H. *et al.* Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. *Biol. Reprod.* **85**, 62–69 (2011).
 - [23.](#) Lyons, J. M. & Asmundson, C. M. Solidification of unsaturated / saturated fatty acid mixtures and its relationship to chilling sensitivity in plants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **42**, 1056–1058 (1965).
 - [24.](#) Brookheart, R. T., Michel, C. I. & Schaffer, J. E. As a matter of fat. *Cell Metab.* **10**, 9–12 (2009).
 - [25.](#) Beeharry, N. *et al.* Linoleic acid and antioxidants protect against DNA damage and apoptosis induced by palmitic acid. *Mutat. Res.* **530**, 27–33 (2003).
 - [26.](#) De Vries, J. E. *et al.* Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. *J. Lipid Res.* **38**, 1384–94 (1997).
 - [27.](#) Gordon, G. B. Saturated free fatty acid toxicity. II Lipid accumulation, ultrastructural alterations, and toxicity in mammalian cells in culture. *Exp. Mol. Pathol.* **27**, 262–276 (1977).
 - [28.](#) Wei, Y., Wang, D., Topczewski, F. & Pagliassotti, M. J. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **291**, E275–E281 (2006).
 - [29.](#) Yoneda, A., Suzuki, K., Mori, T., Ueda, J. & Watanabe, T. Effects of delipidation and oxygen concentration on in vitro. *J. Reprod. Dev.* **50**, 287–295 (2004).
 - [30.](#) Sudano, M. J. *et al.* Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology* **75**, 1211–20 (2011).
 - [31.](#) Galli, C. *et al.* Bovine embryo technologies. *Theriogenology* **59**, 599–616 (2003).
 - [32.](#) IETS. Appendix B . Conclusions of the research subcommittee of the international embryo transfer society health and safety advisory committee. in

- Manual of the International Embryo Technology Society* (eds. Stringfellow, D. A. & Givens, M. D.) 129–130 (IETS, 2011).
- [33.](#) Cabrera, P. & Fernández, A. Criopreservación de embriones: una herramienta básica en la reproducción asistida. *Rev. la Fac. Ciencias Vet. UCV* **47**, 59–69 (2006).
- [34.](#) Thibier, M. Embryo transfer: a comparative biosecurity advantage in international movements of germplasm. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. des Epizoot.* **30**, 177–188 (2011).
- [35.](#) IETS. 2016 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter* **35**, 8–23 (2017).
- [36.](#) Spell, A. R., Beal, W. E., Corah, L. R. & Lamb, G. C. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology* **56**, 287–297 (2001).
- [37.](#) Steel, R. & Hasler, J. F. Pregnancy rates resulting from transfer of fresh and frozen Holstein and Jersey embryos. in *Reproduction, Fertility and Development* **16**, 182–183 (2004).
- [38.](#) Ongubo, M. N. *et al.* Factors affecting conception rates in cattle following embryo transfer. *Uganda J. Agric. Sci.* **16**, 19–27 (2015).
- [39.](#) Eberhardt, B. G., Satrapa, R. A., Capinzaiki, C. R. L., Trinca, L. A. & Barros, C. M. Influence of the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. *Anim. Reprod. Sci.* **114**, 54–61 (2009).
- [40.](#) Lozano-Domínguez, R. R., Asprón-Pelayo, M. A., Vásquez-Peláez, C. G., González-Padilla, E. & Aréchiga-Flores, C. F. Efecto del estrés calórico sobre la producción embrionaria en vacas superovuladas y la tasa de gestación en receptoras. *Rev. Mex. Ciencias Pecu.* **1**, 189–203 (2010).
- [41.](#) Paula-Lopes, F. F. *et al.* Heat stress induced alteration in bovine oocytes: functional and cellular aspects. *Anim. Reprod.* **9**, 395–403 (2012).
- [42.](#) Rocha, A. *et al.* High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology* **49**, 657–665 (1998).
- [43.](#) Zanenga, C. Freezing on zebu embryos -development and viability. in *Congresso Brasileiro de Reproducao Animal* 125–136 (1993).
- [44.](#) McEvoy, T. G., Coull, G. D., Broadbent, P. J., Hutchinson, J. S. M. & Speake, B. K. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* **118**, 163–170 (2000).
- [45.](#) Sudano, M. J. *et al.* Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. *Biol. Reprod.* **87**, 1–11 (2012).
- [46.](#) Nagashima, H. *et al.* Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol. Reprod.* **51**, 618–622 (1994).
- [47.](#) Rizos, D., Fair, T., Papadopoulos, S., Boland, M. P. & Lonergan, P. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* **62**, 320–327 (2002).

- [48.](#) Wang, D., Wei, Y. & Pagliassotti, M. J. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology* **147**, 943–951 (2006).
- [49.](#) Renaville, B. *et al.* Plasma and follicular fluid fatty acid profiles in dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* **45**, 118–21 (2010).
- [50.](#) Zeron, Y., Tomczak, M., Crowe, J. & Arav, A. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. *Cryobiology* **45**, 143–152 (2002).
- [51.](#) Storey, K. B. & Storey, J. M. Freeze tolerance in animals. *Physiol. Rev.* **68**, 27–84 (1988).
- [52.](#) Zeron, Y. *et al.* Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction* **121**, 447–454 (2001).
- [53.](#) Herms, A. *et al.* Cell-to-cell heterogeneity in lipid droplets suggests a mechanism to reduce lipotoxicity. *Curr. Biol.* **23**, 1489–1496 (2013).
- [54.](#) Sekiya, M., Hiraishi, A., Touyama, M. & Sakamoto, K. Oxidative stress induced lipid accumulation via SREBP1c activation in HepG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **375**, 602–7 (2008).
- [55.](#) Bailey, A. P. *et al.* Antioxidant role for lipid droplets in a stem cell niche of drosophila. *Cell* **163**, 340–353 (2015).
- [56.](#) Ballard, C. B. *et al.* 106 Using a buoyant density gradient and Nile red staining to evaluate the lipid content of *Bos taurus* and *Bos indicus* oocytes. in *Reproduction, Fertility and Development* **19**, 170–171 (Csiro Publishing, 2006).
- [57.](#) López-Damián, E. P. *et al.* 155 Characterization of lipid droplets in *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos. in *Reproduction, Fertility and Development* **25**, 226 (Csiro Publishing, 2012).
- [58.](#) Visintin, J. A. *et al.* Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: Are they really different? *Theriogenology* **57**, 345–359 (2002).
- [59.](#) Kacinskis, M. A., Lucci, C. M., Luque, M. C. A. & Bao, S. N. Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* **87**, 45–57 (2005).
- [60.](#) Cummins, J. M. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **115**, S23–S29 (2004).
- [61.](#) Dumollard, R., Duchen, M. & Carroll, J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr. Top. Dev. Biol.* **77**, 21–49 (2007).
- [62.](#) Lopes, A. S., Lane, M. & Thompson, J. G. Oxygen consumption and ROS production are increased at the time of fertilization and cell cleavage in bovine zygotes. *Hum. Reprod.* **25**, 2762–2773 (2010).
- [63.](#) Hiendleder, S. & Wolf, E. The mitochondrial genome in embryo technologies. *Reprod. Domest. Anim.* **38**, 290–304 (2003).
- [64.](#) Circu, M. L. & Aw, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 749–762 (2010).
- [65.](#) Joza, N. *et al.* Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in

- programmed cell death. *Nature* **410**, 549–554 (2001).
- [66.](#) Sudano, M. J. *et al.* Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. *Reprod. Fertil. Dev.* **26**, 1129–1141 (2014).
- [67.](#) Wohlfres-Viana, S., Pereira, M. M., Viana, J. H. M., Machado, M. A. & Camargo, L. S. de A. Comparison of gene expression in *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced in vivo or in vitro. *Livest. Sci.* **140**, 62–67 (2011).
- [68.](#) Cummins, J. M. The role of maternal mitochondria during oogenesis, fertilization and embryogenesis. *Reprod. Biomed. Online* **4**, 176–182 (2002).
- [69.](#) Lei, X. G. *et al.* Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications. *Physiol. Rev.* **96**, 307–364 (2016).
- [70.](#) Satrapa, R. A. *et al.* Influence of sire breed (*Bos indicus* versus *Bos taurus*) and interval from slaughter to oocyte aspiration on heat stress tolerance of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* **76**, 1162–1167 (2011).
- [71.](#) Silva, C. F. *et al.* Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced in vitro. *Theriogenology* **79**, 351–357 (2013).
- [72.](#) Rao, M. M., Umamahesh, Y., Naidu, K. V & Rao, K. B. Direct transfer of *Bos indicus* embryos frozen preserved in ethylene glycol. *Indian Vet. J.* **86**, 1027–1029 (2009).
- [73.](#) Cummins, J. M. Fertilization and elimination of the paternal mitochondrial genome. *Hum. Reprod.* **15**, S92–S101 (2000).
- [74.](#) Brüggerhoff, K. *et al.* Bovine somatic cell nuclear transfer using recipient oocytes recovered by ovum pick-up: effect of maternal lineage of oocyte donors. *Biol. Reprod.* **66**, 367–373 (2002).
- [75.](#) Muldrew, K. & McGann, L. E. Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophys. J.* **57**, 525–532 (1990).
- [76.](#) Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. 10.18.3.2 Therapeutic interventions? in *Free Radicals in Biology and Medicine* 610–611 (Oxford University Press, 2015).
- [77.](#) Rubinsky, B., Mattioli, M., Arav, A., Barboni, B. & Fletcher, G. L. Inhibition of Ca²⁺ and K⁺ currents by " antifreeze " proteins. *Regul. Integr. Comp. Physiol.* **31**, R542–R545 (1992).
- [78.](#) Leibo, S. P., McGrath, J. J. & Cravalho, E. G. Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate. *Cryobiology* **15**, 257–271 (1978).
- [79.](#) Chatterjee, S. & Gagnon, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* **59**, 451–458 (2001).
- [80.](#) Adams, C. W. M., Abdulla, Y. H. & Bayliss, O. B. Osmium tetroxide as a histochemical and histological reagent. *Histochemie* **9**, 68–77 (1967).
- [81.](#) Graham, J. K. & Foote, R. H. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* **24**, 42–52 (1987).
- [82.](#) Shehab-El-Deen, M. A., Leroy, J. L. M. R., Maes, D. & Van Soom, A. Cryotolerance

- of bovine blastocysts is affected by oocyte maturation in media containing palmitic or stearic acid. *Reprod. Domest. Anim.* **44**, 140–142 (2009).
- [83.](#) He, L., Bailey, J. L. & Buhr, M. M. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. *Biol. Reprod.* **64**, 69–79 (2001).
- [84.](#) Suzuki, M., Shinohara, Y., Ohsaki, Y. & Fujimoto, T. Lipid droplets: size matters. *J. Electron Microsc.* **60**, S101–S116 (2011).
- [85.](#) Sanches, B. V. *et al.* Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. *Theriogenology* **80**, 372–377 (2013).
- [86.](#) Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. 10.6 Ischaemia-reperfusion. in *Free Radicals in Biology and Medicine* 539–540 (Oxford University Press, 2015).
- [87.](#) Kaidi, S. *et al.* Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced in vitro. *Biol. Reprod.* **65**, 1127–1134 (2001).
- [88.](#) Loutradis, D., John, D. & Kiessling, A. A. Hypoxanthine causes a 2-cell block in random-bred mouse embryos. *Biol. Reprod.* **37**, 311–316 (1987).
- [89.](#) Adibhatla, R. M. & Hatcher, J. F. Phospholipase A₂, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 376–387 (2006).
- [90.](#) Hinkovska-Galcheva, V., Petkova, D. & Koumanov, K. Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. *Cryobiology* **26**, 70–75 (1989).
- [91.](#) Guerin, P., Mouatassim, S. El & Ménézo, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update* **7**, 175–189 (2001).
- [92.](#) Glasauer, A. & Chandel, N. S. Ros. *Curr. Biol.* **23**, R100–R102 (2013).
- [93.](#) Takahashi, M. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *J. Reprod. Dev.* **58**, 1–9 (2012).
- [94.](#) Mittler, R. *et al.* ROS signaling: The new wave? *Trends Plant Sci.* **16**, 300–309 (2011).
- [95.](#) Halliwell, B. & Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* **142**, 231–255 (2004).
- [96.](#) Alvarez, J. G. & Storey, B. T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J. Androl.* **13**, 232–241 (1992).
- [97.](#) Bilodeau, J.-F., Chatterjee, S., Sirard, M.-A. & Gagnon, C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* **55**, 282–288 (2000).
- [98.](#) Tatone, C., Di Emidio, G., Vento, M., Ciriminna, R. & Artini, P. G. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. *Gynecol. Endocrinol.* **26**, 563–567 (2010).
- [99.](#) Whiteley, G. S., Fuller, B. J. & Hobbs, K. E. Deterioration of cold-stored tissue

- specimens due to lipid peroxidation: modulation by antioxidants at high subzero temperatures. *Cryobiology* **29**, 668–73 (1992).
- [100.](#) Dobretsov, G. E., Borschevskaya, T. A., Petrov, V. A. & Vladimirov, Y. A. The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation. *FEBS Lett.* **84**, 125–128 (1977).
- [101.](#) Richter, C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem. Phys. Lipids* **44**, 175–189 (1987).
- [102.](#) Halliwell, B. & Chirico, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* **57 suppl**, 715S–725S (1993).
- [103.](#) Rosa, D. E., Fazzio, L. E., Picco, S. J., Furnus, C. C. & Mattioli, G. A. Metabolismo y deficiencia de zinc en bovinos. *Analecta Vet.* **28**, 34–44 (2008).
- [104.](#) Kowaltowski, A. J. & Vercesi, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 463–471 (1999).
- [105.](#) Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. 5.4.2.2 Reactive species and apoptosis. in *Free Radicals in Biology and Medicine* 218–219 (Oxford University Press, 2015).
- [106.](#) Castedo, M. *et al.* Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. *J. Immunol. Methods* **265**, 39–47 (2002).
- [107.](#) Nasr-esfahani, M. H., Aitken, J. R. & Johnson, M. H. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or in vivo. *Development* **109**, 501–507 (1990).
- [108.](#) Noda, Y. *et al.* Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol. Reprod. Dev.* **28**, 356–360 (1991).
- [109.](#) Yang, H. W. *et al.* Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum. Reprod.* **13**, 998–1002 (1998).
- [110.](#) Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. 5.11.2 Targets of attack: membrane lipids and proteins. in *Free Radicals in Biology and Medicine* 253–265 (Oxford University Press, 2015).
- [111.](#) Zhao, X. M. *et al.* Melatonin inhibits apoptosis and improves the developmental potential of vitrified bovine oocytes. *J. Pineal Res.* **60**, 132–141 (2015).
- [112.](#) Scheffler, I. E. 5.6.4.4 The Mitochondrial Permeability Transition. in *Mitochondria* 234–235 (Wiley-Liss, 1999).
- [113.](#) Halliwell, B. & Aruoma, O. I. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* **281**, 9–19 (1991).
- [114.](#) Agarwal, A., Said, T. M., Bedaiwy, M. A., Banerjee, J. & Alvarez, J. G. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil. Steril.* **86**, 503–12 (2006).
- [115.](#) Márquez-Alvarado, Y. C., Galina, C. S., Castilla, B., Leon, H. & Moreno-Mendoza, N. Evidence of damage in cryopreserved and fresh bovine embryos using the tunel technique. *Reprod. Domest. Anim.* **39**, 141–145 (2004).
- [116.](#) Godinez, B., Galina, C. S., Moreno-Mendoza, N., Alarcon, M. & Lammoglia, M. A. Use of a culture medium (McCoy®), as a method for evaluating *Bos indicus* × *Bos taurus* embryos. *Anat. Histol. Embryol.* **41**, 274–279 (2012).
- [117.](#) Godinez, B., Galina, C., Leon, H., Gutierrez, M. & Moreno-Mendoza, N. Assessment

- of the viability of embryos stored in liquid nitrogen produced commercially using culture medium as a complementary test for stereoscopic microscopy. *Zigote* **21**, 110–114 (2013).
- [118.](#) Edmonson, A. J., Lean, I. J., Weaver, L. D., Farver, T. & Webster, G. A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* **72**, 68–78 (1989).
- [119.](#) Eversole, D. E., Browne, M. F., Hall, J. B. & Dietz, R. E. Body condition scoring beef cows. *VCE Publ.* **400–791**, 1–6 (2009).
- [120.](#) NRC. *Nutrient requirements of dairy cattle*. National Academic Press **6**, (National Academy Press, 2001).
- [121.](#) Santos, J. E. P., Bilby, T. R., Thatcher, W. W., Staples, C. R. & Silvestre, F. T. Long chain fatty acids of diet as factors influencing reproduction in cattle. *Reprod. Domest. Anim.* **43 Suppl 2**, 23–30 (2008).
- [122.](#) IETS. Certification and identification of embryos. in *Manual of the International Embryo Transfer Society* (eds. Stringfellow, D. & Givens, D.) 86–105 (International Embryos Transfer Society, 2011).
- [123.](#) Rasband, W. S. ImageJ. (1997). Available at: <http://imagej.nih.gov/ij/>. (Accessed: 1st October 2014)
- [124.](#) Wendykier, P. Parallel iterative deconvolution. (2009). Available at: <https://sites.google.com/site/piotrwendykier/software/deconvolution/paralleliterativeconvolution>. (Accessed: 1st October 2014)
- [125.](#) Schmid, M. Gaussian blur filter. (2007). Available at: <https://imagej.nih.gov/ij/developer/api/ij/plugin/filter/GaussianBlur.html>. (Accessed: 1st October 2014)
- [126.](#) Fujimoto, T., Ohsaki, Y., Suzuki, M. & Cheng, J. Chapter 13 - Imaging lipid droplets by electron microscopy. in *Methods in Cell Biology* (eds. Hongyuan, Y. & Peng, L.) **116**, 227–251 (Elsevier B.V., 2013).
- [127.](#) Gardner, D. K., Lane, M. & Watson, A. J. A Laboratory Guide to the Mammalian Embryo. *Molecules* **432** (2004).
- [128.](#) Taffe, B. G., Takahashi, N., Kensler, T. W. & Mason, R. P. Generation of free radicals from organic hydroperoxide tumor promoters in isolated mouse keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **262**, 12143–12149 (1987).
- [129.](#) Nakayama, T., Noda, Y., Goto, Y. & Mori, T. Effects of visible light and other environmental factors on the production of oxygen radicals by hamster embryos. *Theriogenology* **41**, 499–510 (1994).
- [130.](#) Takenaka, M., Horiuchi, T. & Yanagimachi, R. Effects of light on development of mammalian zygotes. *PNAS* **104**, 14289–14293 (2007).
- [131.](#) Ottosen, L. D. M., Hindkjaer, J. & Ingerslev, J. Light exposure of the ovum and preimplantation embryo during ART procedures. *J. Assist. Reprod. Genet.* **24**, 99–103 (2007).
- [132.](#) Fukumoto, S. & Fujimoto, T. Deformation of lipid droplets in fixed samples. *Histochem. Cell Biol.* **118**, 423–428 (2002).
- [133.](#) Welte, M. A. & Gould, A. P. Lipid droplet functions beyond energy storage. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1862**, 1260–1272 (2017).
- [134.](#) Jambunathan, S., Yin, J., Khan, W., Tamori, Y. & Puri, V. FSP27 promotes lipid

- droplet clustering and then fusion to regulate triglyceride accumulation. *PLoS One* **6**, e28614 (2011).
- [135.](#) Lee, S.-J., Zhang, J., Choi, A. M. K. & Kim, H. P. Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 1–10 (2013).
- [136.](#) Lee Jr, R. E., McGrath, J. J., Morason, R. T. & Taddeo, R. M. Survival of intracellular freezing, lipid coalescence and osmotic fragility in fat body cells of the freeze-tolerant Gall Fly *Eurosta solidaginis*. *J. Insect Physiol.* **39**, 445–450 (1993).
- [137.](#) Salt, R. W. Survival of frozen fat body cells in an insect. *Nature* **184**, 1426 (1959).
- [138.](#) Thiam, A. R., Farese Jr., R. V & Walther, T. C. The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 775–786 (2013).
- [139.](#) Vanapalli, S. A., Palanuwech, J. & Coupland, J. N. Stability of emulsions to dispersed phase crystallization: effect of oil type, dispersed phase volume fraction, and cooling rate. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **204**, 227–237 (2002).
- [140.](#) Goodman, J. M. The gregarious lipid droplet. *J. Biol. Chem.* **283**, 28005–28009 (2008).
- [141.](#) Murphy, D. J. & Vance, J. Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 109–115 (1999).
- [142.](#) Fei, W. *et al.* The size and phospholipid composition of lipid droplets can influence their proteome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **415**, 455–462 (2011).
- [143.](#) Wilfling, F., Haas, J. T., Walther, T. C. & Farese Jr., R. V. Lipid droplet biogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **29**, 39–45 (2014).
- [144.](#) Baldoceda, L. *et al.* Breed-specific factors influence embryonic lipid composition: comparison between Jersey and Holstein. *Reprod. Fertil. Dev.* **28**, 1185–1196 (2015).
- [145.](#) Orlicky, D. J., Monks, J., Stefanski, A. L. & McManaman, J. L. Dynamics and molecular determinants of cytoplasmic lipid droplet clustering and dispersion. *PLoS One* **8**, e66837 (2013).
- [146.](#) Marcinkiewicz, A., Gauthier, D., Garcia, A. & Brasaemle, D. L. The phosphorylation of serine 492 of perilipin A directs lipid droplet fragmentation and dispersion. *J. Biol. Chem.* **281**, 11901–11909 (2006).
- [147.](#) Martin, S. & Parton, R. G. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 373–378 (2006).
- [148.](#) Ordoñez-Leon, E. A., Merchant, H., Medrano, A., Kjelland, M. & Romo, S. Lipid droplet analysis using in vitro bovine oocytes and embryos. *Reprod. Domest. Anim.* **49**, 306–314 (2014).
- [149.](#) Maldjian, A. *et al.* Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology* **63**, 411–21 (2005).
- [150.](#) Abe, H., Otoi, T., Tachikawa, S. & Yamashita, S. Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro. *Anat. Embryol.* **199**, 519–527 (1999).
- [151.](#) Fair, T. *et al.* Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation :

- effect of method of blastocyst production. *Mol. Reprod. Dev.* **58**, 186–195 (2001).
- [152.](#) Fu, X.-W. *et al.* Positive effects of Taxol pretreatment on morphology, distribution and ultrastructure of mitochondria and lipid droplets in vitrification of in vitro matured porcine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* **115**, 158–68 (2009).
- [153.](#) Kikuchi, K. *et al.* Morphological features of lipid droplet transition during porcine oocyte fertilisation and early embryonic development to blastocyst in vivo and in vitro. *Zygote* **10**, 355–366 (2002).
- [154.](#) Fujimoto, T. & Parton, R. G. Not just fat: The structure and function of the lipid droplet. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a004838 (2011).
- [155.](#) Storey, K. B. & Storey, J. M. Natural freezing survival in animals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **27**, 365–386 (1996).