

DEPÓSITO LEGAL ZU2020000153

ISSN 0041-8811

E-ISSN 2665-0428

Revista de la Universidad del Zulia

Fundada en 1947
por el Dr. Jesús Enrique Lossada



Ciencias del
Agro,
Ingeniería
y Tecnología

Año 16 N° 45

Enero - Abril 2025

Tercera Época

Maracaibo-Venezuela

Vitrificación de embriones bovinos cultivados en un medio suplementado con β -mercaptoetanol

Emilia Rosa Lliteras-Martínez*

Alejandro Palacios-Espinosa**

Victor Manuel Meza-Villalvazo***

José Abad-Zavaleta****

Peter Bols*****

José Luis Espinoza-Villavicencio*****

Ricardo Ortega-Pérez*****

RESUMEN

Los objetivos de este trabajo fueron evaluar diferentes concentraciones de β -mercaptoetanol durante el cultivo *in vitro* de embriones bovinos y determinar el efecto de la vitrificación en la supervivencia de embriones cultivados en un medio suplementado con β -ME. Experimento 1: post-fertilización, los cigotos fueron asignados a grupos de cultivo con 0, 50, 100 y 150 μ M de β -ME. Experimento 2: los cigotos se cultivaron en presencia o ausencia de 100 μ M de β -ME y fueron vitrificados por el método Cryologic. Se determinó la supervivencia, el total de células e índice de apoptosis como indicadores de calidad y criotolerancia. La tasa de división sigue una tendencia lineal negativa y fue menor a una concentración de 150 μ M de β -ME, no encontrándose diferencias entre las demás concentraciones. El porcentaje de embriones sigue una tendencia cuadrática con una mayor respuesta a una concentración de 100 μ M de β -ME. La suplementación con 100 μ M de β -ME aumentó la supervivencia, el total de células y redujo la apoptosis. Se evidenció que la suplementación del medio de cultivo con β -ME (100 μ M) aumenta el porcentaje de embriones, la supervivencia y el número de células posterior a la vitrificación por el método Cryologic y reduce la apoptosis.

PALABRAS CLAVE: Antioxidante, Crioconservación, Criosupervivencia, Embriones bovinos.

*Universidad Autónoma de Baja California Sur, México. ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-6835-9024>. E-mail: lemiliarosa@gmail.com

**Universidad Autónoma de Baja California Sur, México. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4726-4164>. E-mail: palacios@uabcs.mx

***Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, México. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9870-9442>. E-mail: meza1077@hotmail.com

****Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, México. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4130-8023>. E-mail: joseabadz77@hotmail.com

*****Universidad de Amberes, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Biomédicas y Veterinarias, Laboratorio de Fisiología Veterinaria, Bélgica. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0432-8719>. E-mail: peter.bols@uantwerpen.be

*****Universidad Autónoma de Baja California Sur, México. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8609-8325>. E-mail: jlvilla@uabcs.mx

*****Universidad Autónoma de Baja California Sur, México. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3718-9439>. E-mail: rortega@uabcs.mx

Recibido: 17/07/2024

Aceptado: 08/10/2024

Vitrification of Bovine Embryos Cultured in a Medium Supplemented with β -Mercaptoethanol

ABSTRACT

This study aimed to evaluate different concentrations of β -mercaptoethanol (β -ME) during *in vitro* culture of bovine embryos and determine the effect of vitrification on survival rate of embryos cultured in a medium supplemented with β -ME. Experiment 1: Post-fertilization, zygotes were assigned to culture groups with 0, 50, 100 and 150 μ M β -ME. Experiment 2: zygotes were cultured in presence or absence of 100 μ M β -ME followed by vitrification by Cryologic method. Survival, total cell number and apoptotic rate were used as quality and cryotolerance indicator. Cleavage rate follows a negative linear trend, and it was lower at 150 μ M concentration of β -ME, no differences were found between the other concentrations. Percentage of embryos follows a quadratic trend showing the greatest response to a concentration of 100 μ M of β -ME. It was shown that supplementation with 100 μ M of β -ME during *in vitro* culture increased survival rate and total cells number and reduced the apoptosis.

KEYWORDS: Antioxidant, Cryopreservation, Cryosurvival, Bovine embryo.

Introducción

Aunque la cantidad de embriones producidos *in vivo* que se recolectan y transfieren en todo el mundo se ha estabilizado en los últimos años, la transferencia de embriones producidos *in vitro* continúa en ascenso (Ferre *et al.*, 2020). En el 2016, y por primera vez en la historia registrada, los embriones viables de bovinos que se produjeron *in vitro* superaron a la cantidad de embriones transferibles derivados *in vivo* (Gallego *et al.*, 2022).

Su creciente desarrollo, ha generado nuevos retos en los sistemas de crioconservación debido a que los embriones producidos *in vitro* se ven afectados por varios factores, incluido el sistema de cultivo, la calidad de los ovocitos, la presencia de suero y factores de crecimiento, entre otros (Viana *et al.*, 2018). Los embriones se mantienen por más tiempo en el medio de cultivo, por lo que es probable que el mismo tenga un mayor impacto en el desarrollo embrionario y el número total de células por blastocisto, factores que pueden influir considerablemente en su mayor sensibilidad a la crioconservación y su posterior viabilidad (Truong y Gardner, 2020).

El incremento del estrés oxidativo es responsable de numerosos tipos de daños al embrión. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) tales como el O_2^- , difunden a través de la membrana celular y alteran la mayoría de las moléculas orgánicas, afectando el desarrollo temprano de los embriones (Khazaei y Aghaz, 2017). La modificación oxidativa de los componentes celulares vía ERO (estrés oxidativo), es uno de los procesos más dañinos para la función celular. Las consecuencias son múltiples e incluyen alteraciones mitocondriales, bloqueo de las células del embrión y apoptosis (Torres *et al.*, 2019).

En condiciones fisiológicas, las ERO y los antioxidantes celulares se encuentran en equilibrio. Las células poseen mecanismos para obstaculizar la formación excesiva de radicales libres, incluidas las enzimas específicas que controlan los niveles intracelulares (Sovernigo *et al.*, 2017; Ranjbar *et al.*, 2019).

La adición de antioxidantes a los medios de cultivo mejora la calidad y criotolerancia de los embriones bovinos producidos *in vitro* (Mahmoud *et al.*, 2016). Los Tioles o Mercaptanos son compuestos orgánicos que contienen un grupo funcional formado por un átomo de azufre y un átomo de hidrógeno llamado grupo tiol o sulfhidrilo (-SH) y forman parte de los aminoácidos de las proteínas como es el caso de la cisteína.

El efecto de los compuestos tiol está mediado por el aumento de los niveles de glutatión intracelular (GSH), un antioxidante que protege a las células contra los efectos nocivos del estrés oxidativo al reducir o eliminar las ERO (Sandal, 2018). El GSH es sintetizado a partir de tres aminoácidos (cisteína, ácido glutámico y glicina). El grupo sulfhidrilo de la cisteína, sirve como donador de electrones y es responsable de la actividad biológica del GSH (Anchordoquy *et al.*, 2019).

El β -ME se ha utilizado a una concentración entre 10 μ M y 500 μ M durante la maduración y el cultivo para incrementar la síntesis intracelular de GSH, mantener el estado redox de las células y mejorar la capacidad de desarrollo de embriones en diferentes especies (Hosseini *et al.*, 2009). Sin embargo, no existe consenso respecto a la concentración favorable de β -ME utilizada en los medios de cultivo, tiempo de exposición y el paso dentro del proceso de producción *in vitro* de embriones en el cual la suplementación con β -ME mejora el desarrollo embrionario.

Este estudio tuvo como objetivos: 1) evaluar el efecto de diferentes concentraciones de β -mercaptoetanol durante el cultivo *in vitro* de embriones bovinos, 2) determinar el efecto de

R. Lliteras-Martínez et al //Vitrificación de embriones bovinos cultivados en un medio ... 97-109
la vitrificación sobre superficie sólida en la tasa de supervivencia de embriones bovinos cultivados en un medio suplementado con β -mercaptoetanol.

1. Materiales y métodos

1.1. Recuperación de ovocitos

Los ovarios fueron colectados en un rastro local y se colocaron en solución salina a 38°C (NaCl 0,9 %) suplementada con kanamicina (1%), para después ser transportados al laboratorio. Se lavaron tres veces con solución salina a 38°C, suplementada con 1% de kanamicina y se aspiraron los folículos con un diámetro entre 2- 6 mm. Solo complejos cúmulo ovocitos (CCOs) con un cúmulo no expandido rodeados por cinco o más capas de células de cúmulo (categoría I) fueron madurados *in vitro*.

1.2. Maduración *in vitro*.

Los CCOs fueron lavados en 500 μ L de medio de maduración y luego madurados en grupos de 50 CCOs en 500 μ L de medio de maduración TCM-199 (Life-Technologies, 31150-022) suplementado con L-Glutamina (0,4mM), Piruvato de sodio (0,2mM), Gentamicina (50 μ g/mL), Cisteamina (0,1 μ M), EGF (20ng/mL) en placas de 4 pozos (Nunc®, Langensfeld, Germany) por 24 h en atmósfera húmeda de 5% CO₂ a 38.5°C.

1.3. Fertilización *in vitro*.

Para la producción *in vitro* de los embriones, se utilizó semen de un toro previamente evaluado, el semen fue descongelado y seleccionado por la técnica de doble gradiente de Percoll (90 y 45 %). Los CCOs se coincubaron a una concentración de 1x10⁶ espermatozoide (sp)/mL en medio de fertilización suplementado con 10 μ L/mL de Heparina por 20 horas en atmósfera húmeda de 5% CO₂ y 38.5°C.

1.4. Cultivo *in vitro*.

Para el cultivo *in vitro* (CIV), se utilizó el fluido oviductal sintético (SOF) suplementado con Insulina-transferrina-selenio (10 μ g/mL I; 5.5 μ g/mL T; 6.7ng/mL S) y BSA; 2(w/v) %. Después de la fertilización, se eliminaron las células del cúmulo por agitación con vortex y los presuntos cigotos fueron distribuidos al azar en cuatro grupos de tratamiento con 0, 50, 100 y 150 μ M de β -ME a razón de 25 cigotos por gota de 50 μ L de medio cubiertas de aceite

R. Lliteras-Martínez et al //Vitrificación de embriones bovinos cultivados en un medio ... 97-109 mineral en placas de 4 pozos (Nunc®, Langensfeld, Germany) (Experimento 1). En el experimento 2, los presuntos cigotos se cultivaron en presencia o ausencia de 100 μ M de β -ME (Life Technologies 31350-010). Para todos los grupos el CIV se desarrolló en atmósfera húmeda de 90 % N₂, 5 % O₂ y 5 % CO₂ a 38.5 °C. Se evaluó la competencia del desarrollo de los embriones a partir de la escisión (48 horas post fertilización) y la tasa de blastocistos (7 días post fertilización) y se definieron como el número de cigotos divididos o blastocistos formados por ovocitos madurados, respectivamente.

1.5. Vitrificación de embriones

A los 7 días post fertilización, los embriones en estadio de blastocisto se vitrificaron sobre superficie sólida en dos pasos en pajillas Fiberplug por el método Cryologic con Etilenglicol (EG); Sigma, Aldrich, 03750, Dimetilsulfóxido (DMSO); Sigma, Aldrich, D8418) y sucrosa; Sigma, Aldrich, S1888). Embriones no vitrificados se utilizaron como control. La desvitrificación se realizó a concentraciones decrecientes de sucrosa en medio de calentamiento. La reexpansión del blastocelo y la tasa de eclosión a las 24 y 48 horas después de la desvitrificación, se utilizaron como medida de supervivencia embrionaria. El número de células y el índice de células apoptóticas se evaluaron por tinción con yoduro de propidio y Tunel, para detectar muerte celular asociada a la fragmentación del ADN (Vandaele *et al.*, 2006), como indicador de calidad embrionaria.

1.6. Análisis estadístico

El efecto de los tratamientos sobre la tasa de división, blastocistos, y la proporción de células apoptóticas, se determinó mediante un análisis de regresión logística binaria (Minitab®, 2019), determinándose las tendencias polinomiales en función de la concentración de β -ME. Se utilizó un análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM (SAS, 1996) para el total de células por blastocisto y pruebas de Tukey para las diferencias.

2. Resultados

Las tendencias polinomiales para el porcentaje de divididos y de embriones se presentan en las Figura 1. Se puede observar que la tasa de división sigue una tendencia lineal inversa,

siendo menor la división conforme se incrementa la concentración de β -ME, mientras que, en el caso del porcentaje de embriones, la tendencia polinomial es cuadrática, con una mayor respuesta al nivel de concentración de 100 μ M de β -ME.

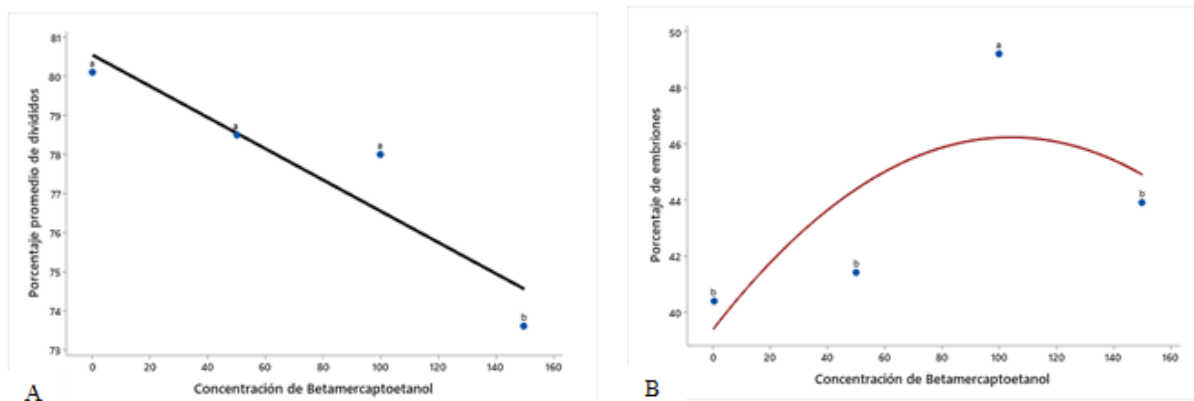


Figura 1. Porcentaje promedio de embriones divididos (A) y porcentaje de embriones obtenidos (B) en respuesta a la concentración de β -mercaptoetanol.

La tabla 1 muestra las tasas de división y de embriones obtenidos a las 48 horas y 7 días post fertilización, respectivamente. Se advierte una disminución en el porcentaje de divididos ($P < 0.05$) a una concentración de 150 μ M de β -ME. No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las demás concentraciones, sin embargo, se puede apreciar que el porcentaje de embriones es mayor ($P < 0.05$) a una concentración de 100 μ M de β -ME.

Tabla 1. Eficiencia de la producción *in vitro* de embriones bovinos cultivados en un medio suplementado con β -mercaptoetanol.

Tratamiento	Porcentaje de Divididos ($\bar{X} \pm E. E$)	Porcentaje de embriones ($\bar{X} \pm E. E$)
50 β -ME	78.5 ^a \pm 2.1	41.4 ^b \pm 2.9
100 β -ME	78.0 ^a \pm 2.1	49.2 ^a \pm 2.9
150 β -ME	73.6 ^b \pm 2.2	43.9 ^b \pm 2.9
CONTROL	80.1 ^a \pm 2.2	40.4 ^b \pm 3.0

Valores dentro de columna con diferente literal indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

La supervivencia embrionaria es un indicador del éxito de la vitrificación (Maslichah y Makuwira, 2023). Se observó un aumento de la supervivencia embrionaria (tabla 2) expresada por la reexpansión del blastocelo a las 24 horas (89.2 \pm 1.2 vs 80.8 \pm 1.5) y 48 horas

R. Lliteras-Martínez et al //Vitrificación de embriones bovinos cultivados en un medio ... 97-109 (89.2±1.2 vs 80.6±1.5) de cultivo post desvitrificación y la tasa de eclosión (88.9 ± 1.2 vs 79.4 ± 1.6) para el grupo tratado con β-ME (100µM) y control no suplementado, respectivamente.

Tabla 2. Supervivencia embrionaria post desvitrificación de embriones bovinos cultivados en un medio suplementado con β-mercaptopetanol.

Tratamiento	Reexpansión 24 h ($\bar{X} \pm E.E$)	Reexpansión 48 h ($\bar{X} \pm E.E$)	Eclosión \bar{X} $\pm E.E$)	Total de células ($\bar{X} \pm E.E$)
Control	91.9±1.3 ^a	91.9±1.3 ^a	91.9±1.3 ^a	135.2±8.01 ^a
100 µM β-ME	89.2±1.2 ^b	89.2±1.2 ^b	88.9 ± 1.2 ^b	136.1±7.26 ^a
Sin β-ME	80.8±1.5 ^c	80.6±1.5 ^c	79.4 ± 1.6 ^c	98.2±4.10 ^b

Valores dentro de columna con diferente literal indican diferencia significativa ($P < 0.05$)

Consistente con los beneficios de los antioxidantes en la calidad y criotolerancia embrionaria (Mahmoud *et al.*, 2016; Soto y Paramio, 2020), observaron que la adición de 100 µM de β-ME al medio de cultivo *in vitro* aumentó significativamente ($P < 0.05$) el número de células totales (136.1±7.26) respecto al grupo no suplementado (98.2±4.10) y fue similar al control no vitrificado (135.2±8.01).

Se observó una reducción significativa de la apoptosis (2.83±0.62 vs 6.13±0.75) respecto al grupo no suplementado y fue similar (2.96±0.55) al grupo control no vitrificado.

3. Discusión

Estudios previos (Caamaño *et al.*, 1996), no mostraron diferencias entre concentraciones bajas (10 µM), medias (50 µM) y altas (100 µM) de β-ME durante el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos. Según Caamaño *et al.* (1998), independientemente de la concentración, el β-ME promueve el desarrollo embrionario.

Un estudio desarrollado por Masaya *et al.* (1999), para determinar el efecto de varios niveles de β-ME durante el cultivo *in vitro*, reveló un mayor porcentaje de embriones bovinos que alcanzaron el estadio de blastocisto cuando se utilizó una concentración de 10 µM respecto al grupo control no suplementado y aquellos cultivados con 50 µM de β-ME. Otros autores (Hosseini *et al.*, 2009), indicaron el mejor efecto para 100 µM desde el primer día de cultivo, con un significativo aumento de la tasa de división y la producción de blastocistos los días 7 y 8 post fertilización. No obstante, Rocha *et al.* (2015) reportaron que una

R. Lliteras-Martínez et al //Vitrificación de embriones bovinos cultivados en un medio ... 97-109 concentración de 100 μM de $\beta\text{-ME}$ y la baja tensión de O_2 durante todo el período de cultivo, fueron perjudiciales para el desarrollo embrionario. Según Rocha *et al.* (2014), la suplementación con antioxidantes durante el CIV reduce las ERO intracelulares y la tasa de apoptosis; sin embargo, no aumenta el desarrollo embrionario ni la supervivencia después de la vitrificación.

Resultados obtenidos por Ahmed *et al.* (2023), revelaron que concentraciones de 25, 50, 100 y 200 μM de βME en el medio de cultivo (SOF) durante la etapa de desarrollo embrionario tiene un efecto beneficioso probablemente atribuido a la función del $\beta\text{-ME}$ en la producción de GSH al aumentar las tasas de producción de blastocistos.

Ribeiro *et al.* (2009), no encontraron diferencias significativas para la tasa de división entre embriones cultivados en un medio suplementado (81.1%) o no (80.2%) con 100 μM de $\beta\text{-ME}$.

Según Ferré *et al.* (2020), el $\beta\text{-ME}$ minimiza los efectos dañinos del estrés oxidativo, promueve el transporte de aminoácidos, la síntesis de ADN y mejora la capacidad de desarrollo y la criotolerancia de los embriones bovinos producidos *in vitro* (27). Por el contrario, Rocha *et al.* (2014), señalan que la suplementación con antioxidantes intracelulares como el $\beta\text{-ME}$, no aumenta el desarrollo embrionario ni la supervivencia después de la vitrificación. Al respecto, de Mattos *et al.* (2022) demostraron que la suplementación con $\beta\text{-ME}$, afectó negativamente el desarrollo embrionario hasta la etapa de blastocisto (28.0% vs 43.8%) pero aumentó la criotolerancia de embriones bovinos cultivados *in vitro*.

Investigaciones previas demostraron que la presencia de $\beta\text{-ME}$ (100 μM) durante el CIV, aumentó la criotolerancia de los embriones resultantes (Caamaño *et al.*, 1998; Ribeiro *et al.*, 2009).

De igual manera, trabajos desarrollados en búfalos (Moussa *et al.*, 2019) en condiciones de estrés oxidativo, demostraron que el uso de $\beta\text{-ME}$ en el medio de cultivo *in vitro*, mejoró significativamente la calidad del blastocisto vitrificado, como lo demuestra la modulación de la expresión de genes importantes asociados con el potencial de desarrollo embrionario. Así mismo, trabajos previos sobre el uso de compuestos tiol durante el proceso de producción *in vitro* de embriones bovinos revelaron que el $\beta\text{-ME}$ estimula la síntesis de GSH, aumenta el

R. Lliteras-Martínez et al //Vitrificación de embriones bovinos cultivados en un medio ... 97-109 número medio de células por blastocisto bovino, disminuye la apoptosis y mejora la calidad de los blastocistos resultantes (Feugang *et al.*, 2004).

Según Choe *et al.* (2010), las diferencias entre los resultados publicados sobre la mejor concentración de β -ME son contradictorios y dependen, entre otros factores, de la etapa del desarrollo embrionario donde se inicia la suplementación, el origen de los ovocitos y la presencia o no de factores de crecimiento. Takahashi *et al.* (1993) informaron una mayor tasa de formación de blastocistos a partir de embriones bovinos de seis a ocho células cultivados con 50 μ M respecto a 10 μ M de β -ME mientras que, Hamano *et al.* (1994) señalaron que embriones bovinos de ocho células se comportaron mejor cuando las concentraciones de β -ME en el medio de cultivo fueron bajas (5 a 10 μ M) que cuando las concentraciones eran altas (50 a 100 μ M).

Conclusiones

Se concluye que la suplementación del medio de cultivo con 100 μ M de β -ME, aumenta el porcentaje de embriones, la tasa de supervivencia y el número de células totales de embriones bovinos vitrificados sobre superficie sólida y reduce la apoptosis *in vitro*.

Referencias

Ahmed EA, Sindi RA, Nasra AY, Hussein HA, Badr MA, Syaad A, Al-Saeed FA, Saad A, Abdelrahman M, & Montaser EA. (2023). Impact of epidermal growth factor and/or β -mercaptoethanol supplementations on the *in vitro* produced buffaloes' embryos. *Frontiers in Veterinary Science*, 10: 1-11 <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1138220>

Anchordoquy JP, Lizarraga RM, Anchordoquy JM, Nikoloff N, Rosa DE, Fabra MC, Peral-García P, & Furnus CC. (2019). Effect of cysteine, glutamate and glycine supplementation to *in vitro* fertilization medium during bovine early embryo development. *Reproductive Biology*, 19(4): 349–355. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2019.10.002>

Caamaño JN, Ryoo ZY, Thomas JA, & Youngs CR. (1996). β -Mercaptoethanol Enhances Blastocyst Formation Rate of Bovine *in vitro*-Matured/*in vitro*-Fertilized Embryos. *Biology Reproduction*, 55(5), 1179–1184. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.5.1179>

Caamaño JN, Zae YR, & Youngs CR. (1998). Promotion of Development of Bovine Embryos Produced *In Vitro* by Addition of Cysteine and β -Mercaptoethanol to a Chemically Defined Culture System. *Journal of Dairy Science*, 81(2): 369–374. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(98\)75586-9](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(98)75586-9)

Choe C, Yong SS, Eun KK, Cho SR, Hyun JK, Choi S, Han M, Han J, Son D, & Kang D. (2010). Synergistic Effects of Glutathione and BETA-Mercaptoethanol Treatment During In Vitro Maturation of Porcine Oocytes on Early Embryonic Development in a Culture System Supplemented with L-cysteine. *Journal of Reproduction and Development*, 56(6): 575–582. <https://doi.org/10.1262/jrd.09-214h>

de Mattos K, Pena BCA, Campagnolo K, Borba de Oliveira G, Ticiani E, Pinzón OCA, da Silva FAL., da Silva FH, Rodrigues JL, Bertolini M, Mezzallira A, & de Souza RE. (2022). β -Mercaptoethanol in culture medium improves cryotolerance of in vitro-produced bovine embryos. *Zygote*, 30(6): 830–840. <https://doi.org/10.1017/s0967199422000338>

Ferré LB, Kjelland ME, Taiyeb AM, Campos-Chillon F, & Ross PJ. (2020). Recent progress in bovine in vitro-derived embryo cryotolerance: Impact of in vitro culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. *Reproduction in Domestic Animals*. 55(6): 659–676. <https://doi.org/10.1111/rda.13667>

Feugang JM, De Roover R, Moens A, Léonard S, Dessy F, & Donnay I. (2004). Addition of β -mercaptoethanol or Trolox® at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. *Theriogenology*, 61(1): 71–90. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00191-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00191-2)

Gallego F, Mancheno A, Mena L, & Murillo A. (2022). Bovine in vitro Embryo Production: State of the Art. ESPOCH Congresses: *The Ecuadorian Journal of S.T.E.A.M.*, 172–185. <https://doi.org/10.18502/epoch.v2i2.11192>.

Hamano S, Kuwayama M, Takahashi M, Okamura N, Okano A, & Nagai T. (1994). Effect of β -Merchптоethanol on the Preimplantation Development of Bovine Embryos Fertilized In Vitro. *Journal of Reproduction and Development*, 40(4): 355–359. <https://doi.org/10.1262/jrd.40.355>

Hosseini SM, Forouzanfar M, Hajian M, Asgari V, Abedi P, Hosseini L, Ostadhosseini S, Moulavi F, Safahani M, Sadeghi H, Bahramian H, Eghbalsaied S, & Nasr-Esfahani MH. (2009). Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 26(6): 355–364. <https://doi.org/10.1007/s10815-009-9317-7>

Khazaei M & Aghaz F. (2017). Reactive Oxygen Species Generation and Use of Antioxidants during In Vitro Maturation of Oocytes. *Int. Journal Fertility and Sterility*, 11(2): 63–70. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2017.4995>

Mahmoud KGM, El-Sokary MMM, Kandiel MMM, Abou El-Roos MEA, & Sosa GMS. (2016). Effects of cysteamine during in vitro maturation on viability and meiotic competence of vitrified buffalo oocytes. *Iranian Journal of Veterinary Research, Summer*, 17(3): 165–170. <https://doi.org/10.22099/IJVR.2016.3810>

R. Lliteras-Martínez et al //Vitrificación de embriones bovinos cultivados en un medio ... 97-109

Masaya G, Yonai M, Sakaguchi M, & Nagai T. (1999). Improvement of in vitro co-culture systems for bovine embryos using a low concentration of carbon dioxide and medium supplemented with β -mercaptoethanol. *Theriogenology*, 51(3): 551–558. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(99\)00009-6](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00009-6)

Maslichah M, & Makuwira J. (2023). Analysis of mice (*Mus Musculus L.*) and hamster embryo development using culture and vitrification medium: Systematic review. *Open Veterinary Journal*, 13(2): 143–143. <https://doi.org/10.5455/ovj.2023.v13.i2.2>

Moussa M, Yang CY, Zheng HY, Li MQ, Yu NQ, Yan SF, Huang JX, & Shang JH. (2019). Vitrification alters cell adhesion related genes in pre-implantation buffalo embryos: Protective role of β -mercaptoethanol. *Theriogenology*, 125: 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.013>

Ranjbar A, Amin M, Mehran, & Moghadam F. (2019). Effect of Cysteamine and 13-Cis-Retinoic Acid on Bovine In Vitro Embryo Production. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 25(2):231-237. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2018.20778>

Ribeiro ES, Gonçalves MC, Pedrotti MC, Martins LT, Gerger RPC, Vieira FK, Tavares KCS, Bertolini M, & Mezzalira A. (2009). 74 Effect of beta-mercaptoethanol on the vitrification cryotolerance of bovine *in vitro*-produced embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 21(1): 137-138. <https://doi.org/10.1071/rdv21nlab74>

Rocha FNA de S, Leão BC da S, Nogueira É, Accorsi MF, & Mingoti, GZ. (2015). Effects of gaseous atmosphere and antioxidants on the development and cryotolerance of bovine embryos at different periods of in vitro culture. *Zygote*, 23(2): 159–168. <https://doi.org/10.1017/s0967199413000361>

Rocha FNA de S, Leão BCS, Nogueira E, Accorsi MF, & Gisele ZM. (2014). Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and apoptotic status are not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos produced in vitro in the presence of antioxidants. *Reproduction, Fertility and Development*, 26(6): 797–797. <https://doi.org/10.1071/rd12354>

Sandal AI. (2018). In vitro maturation of bovine oocytes: beneficial effects of cysteamine. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, 7(2): 64-65. <https://doi.org/10.15406/jdvar.2018.07.00191>

SAS. (1996). User's guide. Statistics. Inst Inc.

Sidi S, Bogado OP, Velez AD, Nima AD, Krishna CP, Gretania R, Meese T, Filip Van N, Bawa EK, Voh AA, Olusegun JA, & Van Soom A. (2022). Lycopene Supplementation to Serum-Free Maturation Medium Improves *In Vitro* Bovine Embryo Development and Quality and Modulates Embryonic Transcriptomic Profile. *Antioxidants* 11(2): 344–344. <https://doi.org/10.3390/antiox11020344>

Software estadístico MINITAB 19. (2019). State College, PA Mnitab, Inc.

Soto HS, & Paramio MT. (2020). Impact of oxidative stress on oocyte competence for in vitro embryo production programs. *Research in Veterinary Science*, 132: 342–350. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.07.013>

Sovernigo T, Adona P, Monzani P, Guemra S, Barros F, Lopes F, & Leal C. (2017). Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(4): 561–569. <https://doi.org/10.1111/rda.12946>

Takahashi M, Nagai T, Hamano S, Kuwayama M, Okamura N, & Okano A. (1993). Effect of Thiol Compounds on in Vitro Development and Intracellular Glutathione Content of Bovine Embryos. *Biology Reproduction*, 49(2): 228–232. <https://doi.org/10.1095/biolreprod49.2.228>

Torres V, Urrego R, Echeverri JJ, & López A. (2019). Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en la producción in vitro de embriones mamíferos. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 10(2): 433–459. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i2.4652>

Truong TT & Gardner DK. (2017). Antioxidants increase blastocyst cryosurvival and viability post-vitrification. *Human Reproduction*, 35(1): 12–23. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez243>.

Vandaele L, Mateusen B, Maes D, de Kruif A, & Van Soom A. (2006). Is apoptosis in bovine in vitro produced embryos related to early developmental kinetics and in vivo bull fertility? *Theriogenology*, 65(9): 1691–1703. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.014>

Viana JHM, Figueiredo ACS, Gonçalves RLR, & Siqueira LGB. (2018). A historical perspective of embryo-related technologies in South America. *Animal Reproduction*, 15(Suppl. 1): 963–970. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0016>.

Conflicto de interés

Los autores de este manuscrito declaran no tener ningún conflicto de interés.

Declaración ética

Los autores declaran que el proceso de investigación que dio lugar al presente manuscrito se desarrolló siguiendo criterios éticos, por lo que fueron empleadas en forma racional y

R. Lliteras-Martínez et al //Vitrificación de embriones bovinos cultivados en un medio ... 97-109
profesional las herramientas tecnológicas asociadas a la generación del conocimiento.

Copyright

La *Revista de la Universidad del Zulia* declara que reconoce los derechos de los autores de los trabajos originales que en ella se publican; dichos trabajos son propiedad intelectual de sus autores. Los autores preservan sus derechos de autoría y comparten sin propósitos comerciales, según la licencia adoptada por la revista

Licencia Creative Commons

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional



REVISTA DE LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA, Fundada el 31 de mayo de 1947

UNIVERSIDAD DEL ZULIA, Fundada el 11 de septiembre de 1891