



Universidad de la República UDELAR
Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)
Área: Biología
Sub-área: Ciencias Fisiológicas



Maduración *in vitro* de ovocitos en medio delipidado: impacto sobre el contenido lipídico citoplasmático, la sobrevivencia a la vitrificación y el desarrollo embrionario.

Autor: Mg. Natalibeth Barrera Hurtado.

Orientador: Alejo Menchaca, DMV, MSc, PhD.
Co-orientador: Martina Crispo, DMV, PhD.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todos los que creyeron en mí hace 8 años atrás cuando recién llegaba al Uruguay. Agradezco al Dr. Menchaca y a la Dra. Crispo por darme la oportunidad de formar parte de su equipo, cuando aún no tenían ninguna referencia personal de mis cualidades profesionales, sino únicamente los papeles que traía en mi valija.

Quiero agradecer a mis compañeros Federico Cuadro, Pedros Dos Santos, Diego Bosolasco, Victoria de Brum, Ana Paula Mulet, Sergio Ancheta y todos los miembros del IRAUy y la UATE por su colaboración en los experimentos, por su apoyo técnico y sobre todo por su amistad. Gracias a Nicolás Pallas por su apoyo emocional y logístico, durante largas faenas e idas al frigorífico. Gracias a la familia, a mi madre quien nunca me ha dejado de enseñar lo importante de perseverar y culminar con éxito las metas que nos proponemos.

Además quiero agradecer a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII; POSNAC201311217), por la beca que me otorgaron para poder realizar mis estudios de Maestría y al programa de PEDECIBA por su apoyo financiero e institucional.

Gracias Uruguay por permitirme seguir mis estudios junto a excelentes profesionales e instituciones, que han enriquecido mi desempeño laboral y por regalarme en este camino extraordinarios amigos.

ESTRUCTURA DE LA TESIS Y PUBLICACIÓN

Esta tesis reúne información generada en una serie de experimentos que fueron realizados en las Instalaciones del Instituto Pasteur de Montevideo y el Instituto de Reproducción Animal Uruguay. Esta tesis permitió la publicación de un artículo en forma de *full original article* en una revista internacional de alto impacto. En el manuscrito central de la tesis se presentan los aspectos más destacados. La publicación completa se anexa al final.

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	5
MARCO TEÓRICO	7
Introducción.....	7
Maduración <i>in vitro</i> (MIV)	8
Criopreservación de CCOs.....	12
Métodos de vitrificación en mínimo volumen	14
Estrés en el retículo endoplásmico (RE) de CCOs	21
CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	24
HIPOTESIS	24
OBJETIVOS.....	25
Objetivo General	25
Objetivos Específicos	25
ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN	26
Experimento 1: Maduración en suero delipidado.....	26
Experimento 2: Delipidación en MIV y vitrificación de ovocitos	26
Experimento 3: Estrés en el RE asociado a MIV y vitrificación de ovocitos.....	27
Producción de Suero de Oveja en estro, delipidación y determinación de lípidos.	29
Colecta ovárica y obtención de los CCOs.....	31
Maduración <i>in vitro</i> (MIV)	31
Fertilización <i>in vitro</i> (FIV).....	32
Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	33
Vitrificación de ovocitos por el método Cryotop	33
Tinción de gotas lipídicas.....	34
Medición del contenido de gotas lipídicas en el citoplasma de ovocitos.	35
PCR cuantitativa	35
Análisis estadísticos	37
Experimento 1.....	39
Experimento 2.....	41
Experimento 3.....	44
DISCUSIÓN.....	45
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	52
REFERENCIAS	53
PUBLICACIÓN.....	61

ABREVIATURAS

AGNE ácidos grasos no esterificados

BSA Albúmina sérica bovina

CCO Complejos cúmulos-ovocitos

CHOP Proteína Homóloga C/EBP

CIV Cultivo *in vitro*

FIV Fertilización *in vitro*

MEM *Minimal Essential Medium*

MIV Maduración *in vitro*

PIV Producción *in vitro*

RE Retículo endoplásmico

SOF *Synthetic oviduct fluid*

SSS *Synthetic serum substitute*

TCM *Tissue Culture Medium*

UPR *Unfolded Protein Response*

RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue determinar si la delipidación del suero de oveja en estro usado en la suplementación del medio de maduración *in vitro* afecta el contenido de gotas lipídicas citoplasmáticas, el desarrollo embrionario y la sobrevivencia del ovocito a la vitrificación. En el Experimento 1, complejos cúmulos-ovocitos (CCOs) fueron madurados *in vitro* por 24 h en medio suplementado con suero de oveja en estro delipidado o no (suero completo), y posteriormente fueron fertilizados y cultivados *in vitro* para evaluar la producción de embriones. La presencia de gotas lipídicas –determinada por la intensidad media de fluorescencia de los ovocitos- fue menor en los ovocitos madurados en el medio delipidado que en el medio completo (grupo control) (7.6 ± 1.7 vs. 22.8 ± 5.0 ; $P < 0.05$). No hubo diferencia en el desarrollo embrionario entre los ovocitos madurados con suero completo o delipidado. En el Experimento 2, utilizando el mismo diseño experimental (maduración con suero delipidado o entero), los ovocitos fueron sometidos o no a vitrificación. Los ovocitos vitrificados (delipidados y no delipidados) mostraron una peor competencia ovocitaria al compararlo con los grupos frescos sin vitrificar, con una menor producción de embriones *in vitro* ($P < 0.05$). En el Experimento 3, siguiendo el mismo diseño con ovocitos madurados en medio delipidado o entero, se evaluó la expresión de genes asociados a la activación de respuestas asociadas al estrés en el retículo endoplásmico. Los ovocitos madurados en medio suplementado con suero delipidado y posteriormente vitrificados aumentaron la expresión de los genes *ATF4*, *ATF6*, *GRP78*, y *CHOP*, sugiriendo activación de una respuesta asociada al restablecimiento de la homeostasis. En conclusión, el uso de suero de oveja en estro delipidado en el medio de maduración *in vitro* reduce la presencia de gotas citoplasmáticas en el ooplasma post-maduración, pero sin mejorar el desarrollo embrionario y la sobrevivencia del ovocito a la vitrificación. Una mayor expresión de los genes asociados al estrés en el retículo endoplásmico es observado cuando los CCOs son madurados en medio delipidado y sometidos al proceso de vitrificación.

MARCO TEÓRICO

Introducción

La producción *in vitro* (PIV) de embriones representa una biotecnología reproductiva con múltiples aplicaciones en los sistemas de producción animal, en investigación y en medicina humana. Si consideramos que una hembra nace aproximadamente con 300 a 500 mil ovocitos (en rumiantes) o 1 a 2 millones de ovocitos (en humanos)[1] con la potencialidad de generar nuevos individuos, y que apenas unos pocos nacimientos ocurren en la vida de cada hembra, resulta muy clara la baja eficiencia reproductiva de estas especies. Dicho de otro modo, el potencial reproductivo de una hembra es enorme y sin embargo se está muy lejos de alcanzarlo mediante las estrategias naturales. En los sistemas pecuarios la reproducción es un proceso determinante para el mejoramiento genético de la población. Los manejos tradicionales de la reproducción aplicados al mejoramiento genético, aunque son ampliamente utilizados en todo el mundo, presentan múltiples limitaciones, entre ellas, la capacidad natural de la hembra de producir una cría por ciclo reproductivo (en general una cría por año). El uso de los sistemas de PIV logra entre otras cosas, aumentar la capacidad de procrear de la hembra; por ejemplo colectándose más ovocitos en forma frecuente y por períodos prolongados, incluso en animales prepúberes o en gestación, o con problemas reproductivos adquiridos. Este sistema tiene múltiples beneficios para el progreso genético al disminuir el intervalo generacional y aumentar el número de la progenie, potenciando la multiplicación de animales con características productivas de interés. Además, representa una atractiva tecnología para la multiplicación de animales en riesgo de extinción y como modelo de investigación de ciencias básicas y aplicadas para diversos estudios referentes al desarrollo embrionario temprano, reprogramación nuclear y clonación, transgénesis, modelos animales para el estudio de la pareja infértil, entre otras [1]

Entre las técnicas de reproducción asistida, la PIV es considerada una tecnología de alta complejidad. El primer bebé de probeta fue reportado en 1978 en Inglaterra, logro que mereció el premio Nobel a Robert Edwards en 2010. En rumiantes, los primeros nacimientos fueron reportados en la década de 1980 en vacas [2] y en la década de 1990 en ovejas [3]. En Uruguay no se había logrado el nacimiento de corderos producidos por esta tecnología hasta 2011, reportado por el Laboratorio en el que se realizó esa tesis [4]. La PIV comprende una serie de etapas que pueden resumirse en la colecta de ovocitos, maduración *in vitro* (MIV), fertilización *in vitro* (FIV) y cultivo *in vitro* de embriones (CIV). Finalmente, los embriones producidos son transferidos frescos al útero de hembras receptoras o criopreservados para una posterior transferencia. Las diferentes etapas en la producción de embriones *in vitro* en ovejas han sido revisadas recientemente por nuestro grupo y la metodología para llevar adelante todos los procedimientos se encuentran disponible [5]

Maduración *in vitro* (MIV)

La MIV de ovocitos es una estrategia que permite madurar ovocitos fuera del animal, en el laboratorio, sin necesidad del control fisiológico y/o el uso de protocolos hormonales en la hembra [6]. Los CCOs son cultivados entre 22-24 h en TCM 199 suplementado con hormonas, cisteamina, antibióticos y una fuente de proteínas y de otras macromoléculas como por ejemplo suero de oveja en estro [5]. Si bien esta tecnología resulta promisorio en los sistemas de PIV de embriones, estudios de transferencia embrionaria recíproca han demostrado que sin importar donde se cultive el embrión, es decir *in vitro* (en el laboratorio) o *in vivo* (oviducto de la hembra), la tasa de desarrollo a blastocisto cuando los ovocitos fueron madurados *in vitro* es aproximadamente un 35%. Sin embargo, si el ovocito es madurado *in vivo*, se obtiene una tasa de blastocisto cercana al 80%, sin importar donde se realice el desarrollo embrionario (*in vivo* o *in vitro*) [7]. Por lo tanto, la eficiencia de la MIV es limitada por la capacidad intrínseca de cada ovocito de ser fertilizado (competencia molecular, citoplasmática y nuclear), producir un embrión viable, capacidad de lograr el establecimiento de la preñez y llegar al término de la

gestación [8]. Asimismo, el ambiente en el que se realice dicha maduración en el laboratorio (medios de cultivo, temperatura, humedad, composición de gases) también afecta el éxito del proceso.

La MIV difiere de la maduración *in vivo* de ovocitos en dos aspectos muy importantes: primero, los CCOs son aspirados de folículos ováricos que poseen un diámetro entre 3-6 mm (en el caso de ovejas) y que algunos de ellos pueden encontrarse en atresia o en una fase de desarrollo inadecuada, dando lugar a ovocitos en diferente estado de capacitación para brindar soporte a la embriogénesis temprana. En segundo lugar, la remoción mecánica de los CCOs de los folículos origina la maduración espontánea de los mismos, eliminándose la acción de factores inhibitorios presentes en el líquido folicular en el que se encuentra en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, la reanudación de la meiosis ocurre por diferentes mecanismos y cascadas de señalización. La maduración de ovocitos *in vivo* es un mecanismo complejo regulado por un componente endocrino (eje hipotálamo-hipófisis-ovárico) y un componente paracrino-autocrino a nivel del folículo [9]. El pico de LH previo a la ruptura del folículo (20-24 h antes de la ovulación) origina una serie de eventos a nivel nuclear, citoplasmático y molecular los cuales transforman el ovocito primario en un ovocito secundario maduro y competente, receptivo al proceso de fertilización y capaz de sustentar el desarrollo embrionario. Es por tanto esperable que los embriones provenientes de ovocitos madurados *in vitro* tengan un menor potencial de desarrollo comparados con los madurados *in vivo* [10].

Suplementación de los medios de cultivo para PIV con suero

Los medios de cultivos utilizados para la MIV de ovocitos son medios con formulaciones complejas, por lo general utilizados para el cultivo de células somáticas y tejidos, los cuales tienen necesidades metabólicas diferentes a la de los CCOs. Ejemplo de estos medios son el TCM 199 (del inglés: *Tissue Culture Medium*) y el MEM (del inglés: *Minimal Essential Medium*). El uso de estos tipos de medios representa una carencia en el sistema de MIV y numerosos esfuerzos se han realizado para

tratar de formular un medio específico para MIV de ovocitos [6]. La adición de gonadotropinas al medio de MIV es usada de forma habitual, observándose mejoras en las tasas de maduración y en el número total de embriones viables [11]. Además, otros factores encontrados en el líquido folicular han sido agregados al medio de MIV con la finalidad de incrementar el número de ovocitos que alcanza el estadio de blastocisto; así se pueden mencionar la hormona de crecimiento, ácido hialurónico, antioxidantes intracelulares (cisteamina y/o cisteína), líquido folicular, estradiol, suero, entre otros [12]–[14]. De particular interés resulta la adición de suero al medio de MIV. Diferentes tipos de suero han sido utilizados, suero de oveja, suero bovino fetal, suero humano, suero de oveja en estro, entre otros. [9], [15]. Se ha reportado que el suero posee hormonas, elementos trazas, factores de crecimiento, y además sirve como osmolito, surfactante, fuente proteica, y quelante de metales pesados [15]. Los resultados de la PIV en aquellos medios suplementados con suero durante la maduración en general son mejores que cuando no se utiliza este componente [1].

Si bien existe consenso sobre el beneficio de agregar suero en el medio para la maduración *in vitro* en casi todas las especies, en ciertas situaciones el suero puede originar resultados variables dependiendo de la fuente y de los componentes indefinidos que éste contiene, originando cambios a nivel subcelular [1]. Una de las consecuencias no deseadas del suero, por ejemplo, es el riesgo de modificar la composición lipídica de embriones y ovocitos [16]. Existe evidencia de que el uso del suero en el medio de cultivo puede alterar el metabolismo del embrión y puede incrementar el contenido de ácidos grasos en el blastocisto [17]. Su adición en la etapa de cultivo *in vitro* (luego de la fertilización) ha sido asociada a la acumulación lipídica en forma de gotas citoplasmáticas [18]. Las gotas lipídicas citoplasmáticas son importantes como reservorio energético y nutricional para el desarrollo embrionario, pero también pueden causar cambios físicos y funcionales de las propiedades de las membranas, alterando su resistencia a bajas temperaturas y por tanto causando daño celular [19]. Se ha reportado que el cultivo de embriones en medios suplementados con suero bovino fetal puede causar un exceso de lípidos en el

citoplasma alterando su tolerancia a la vitrificación [20]. Otros estudios han demostrado que la reducción de las gotas citoplasmáticas mejora la tolerancia de los embriones a los procesos de criopreservación [21], [22], sin embargo se ve afectado el potencial desarrollo de los blastocistos, sugiriendo que el almacenamiento de lípidos posdescogelación favorece la recuperación metabólica del embrión [23]. Además, dependiendo de la etapa en la que se use el suero podría tener diferentes efectos sobre los resultados de la PIV, es así como la suplementación del medio de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos con 10% de SBF parece disminuir su potencial de desarrollo a blastocisto, cuando se lo comparó con un grupo madurado sin suero y suplementado con otros factores de crecimiento [24]. Además, su presencia durante el cultivo (desde la fertilización hasta el estadio de blastocisto) puede acelerar el desarrollo aumentando el número de células en los blastocistos [25]. Esto si bien en principio parece favorable, se lo ha asociado a la aparición de LOS (del inglés: *Large Offspring Syndrome*) con el nacimiento de crías extremadamente grandes y muertes perinatales [26]- Otros efectos negativos han sido asociados al uso del suero en el medio de cultivo incluyendo degeneración mitocondrial, formación prematura del blastocele, presencia de células oscuras y granuladas en la masa celular interna de blastocistos, aumento de células apoptóticas y menor síntesis proteica[22].. Por todo ésto, se puede inducir que la exposición de ovocitos y embriones a medios suplementado con suero puede alterar su morfología y bioquímica [27].

Debido a estas dificultades relacionadas con la adición de suero a los medios de CIV, se ha propuesto el uso de moléculas sintéticas (SSS: del inglés: *Synthetic serum substitute*) en el cultivo de embriones, usándose extensivamente en el cultivo de embriones humanos con resultados positivos sobre las tasas de producción de blastocisto y de embarazo. Sin embargo, el uso de suero sintético es menos común en los sistemas de PIV de animales de producción. Los problemas vinculados al cultivo de los embriones no son tan claros cuando se utiliza el suero en la maduración de los ovocitos. Moore (2007) comparó la MIV de ovocitos bovinos en TCM 199 suplementado con SBF o con suero sintético

observando que la tasa de desarrollo a blastocisto fue menor en el grupo que había sido suplementado con suero sintético (21,5% vs. 34,1%) [18]. Probablemente, la complejidad o diversidad en la composición del suero, si bien se ha asociado a efectos adversos para el embrión, posee a la vez efectos favorables que no han podido ser aun alcanzados con el uso de componentes sintéticos.

En conclusión, el uso de suero en los sistemas de PIV parecen tener dos vertientes, por un lado algunos autores reportan un efecto beneficioso sobre el desarrollo embrionario, incrementándose las tasas de desarrollo a blastocisto, el número de células y la calidad embrionaria, mientras que por el otro, otros autores observan cambios en el metabolismo embrionario, aumento en las concentraciones de gotas citoplasmáticas y peores resultados de sobrevida a los procesos de criopreservación.

Criopreservación de CCOs

La criopreservación de gametos representa una biotecnología reproductiva de gran beneficio, mejorando entre otras cosas limitaciones referentes a la disponibilidad reproductiva de machos y hembras, además permite la conservación y propagación del genotipo de un individuo incluso después de su muerte, así como la conservación de genotipos de especies en extinción [28]. Gracias a este proceso es posible la disociación temporal y espacial en la disponibilidad de material genético que permite la criopreservación de gametos y de embriones. Esto ha favorecido de manera significativa el comercio internacional de genética bovina y ovina que hoy representa una gran industria en todo el mundo, permitiendo también el control o incluso la erradicación de enfermedades de gran impacto.

El proceso de criopreservación implica una serie de pasos que comienzan con la exposición de la estructura, el tejido o las células a los agentes crioprotectores, el enfriamiento a temperaturas inferiores a 0°C, su almacenamiento en nitrógeno líquido (-196°C), y también el descongelamiento y la remoción de los crioprotectores con restauración de las condiciones fisiológicas iniciales. Durante este complejo proceso las células deben mantener su integridad estructural y funcional, lo cual les permitirá restablecer

sus procesos fisiológicos con normalidad una vez que han sido descongeladas. Los daños morfológicos y funcionales que sufren los gametos y embriones causados por la criopreservación dependen de diferentes factores vinculados a la estructura a criopreservar o a la técnica utilizada. Aquellos factores vinculados a la estructura (espermatozoides, ovocitos o embriones), dependen del tamaño, la forma y número células, permeabilidad de las membranas, viabilidad, estadio embrionario y origen (*in vivo* vs. *in vitro*) [29]. La criopreservación de gametos, y en particular la de ovocitos, a diferencia de la criopreservación de embriones, tejidos o cultivos celulares, cuenta con la particularidad que se intenta preservar una célula en forma individual y que la sobrevivencia o la muerte define el éxito o el fracaso absoluto de la técnica. Además la criopreservación de gametos femeninos requiere una eficiencia mayor mientras que un eyaculado contiene miles de millones de espermatozoides y la sobrevivencia de unos pocos ya sería suficiente, el folículo contiene un solo ovocito y entonces el rendimiento de la técnica debería ser cercano al 100%.

Con respecto a las técnicas utilizadas para criopreservar ovocitos, actualmente se pueden clasificar en dos métodos: el método tradicional (congelación lenta) y la vitrificación. El método de congelación lenta utiliza concentraciones bajas de agentes crioprotectores ($\sim 1,5M$) y tasas de enfriamiento relativamente lentas que varían entre $0.3-2^{\circ}C/min$. La vitrificación por su parte utiliza más altas concentraciones de crioprotectores y básicamente es un método rápido que reduce la sensibilidad celular asociada a los procesos de enfriamiento y los daños asociados a la cristalización. Durante el proceso de congelación lenta, el riesgo que se presenta es que el agua contenida en el medio extra e intracelular puede precipitar y promover la formación de cristales de hielo. Las principales consecuencias de esta formación de cristales son fractura de la zona pelúcida, alteraciones de los organelos intracelulares y del citoesqueleto [30]. Este método fue el primero en usarse para criopreservar embriones y ovocitos de ratón en los años 1970 [31]. En 1986, se reportó el primer embarazo a partir de un ovocito humano congelado por esta técnica [32]. Además se han reportado nacimientos en numerosas especies de

animales domésticos incluyendo conejo [33], bovinos [34], equinos [35], ovinos [36], entre otros. Sin embargo, la eficiencia de la técnica basada en el número de embriones viables obtenido por ovocito es baja al compararla con ovocitos frescos, tanto en animales domésticos como en humanos [36]–[39]. Esto podría atribuirse a la fragilidad del ovocito al ser expuesto a los procesos de enfriamiento lento y descongelación, principalmente debido a su complejidad estructural. Los ovocitos de mamíferos son células grandes cuya relación superficie-volumen es pequeña [40]. Esta característica hace que el proceso de penetración de los crioprotectores en bajas concentraciones sea difícil, originando mayor grado de dificultad al proceso de criopreservación. Además, la membrana plasmática de los ovocitos muestra importantes diferencias con la membrana del embrión [41]. Una vez que se ha completado la fertilización, aumentan los niveles de calcio intracelular, lo que modifica la fuerza iónica y el potencial de membrana, aumentando la concentración de filamentos de actina y su conformación; esto facilita la difusión de agua y crioprotectores que promueven la deshidratación, reduce la formación de cristales, aumenta la tolerancia a los cambios osmóticos y permite que los embriones –comparados con los ovocitos– resistan mejor la congelación y descongelación [40]. En la práctica clínica o en la aplicación de estas tecnologías en el campo, la técnica de congelación lenta no ofrece tasas aceptables de supervivencia ovocitaria y de preñez. Esto originó una variedad de experimentos y estudios a lo largo de los años que consistieron en la variación de todos los factores posibles, evaluando diferentes tipos y concentraciones de crioprotectores, diversos volúmenes a criopreservar, y distintos dispositivos diseñados para contener al ovocito. Así surgió la vitrificación como una nueva metodología de criopreservación de ovocitos, con resultados verdaderamente alentadores en numerosas especies [39], [42], [43].

Métodos de vitrificación en mínimo volumen

El principio en el que se sustenta la vitrificación es el hecho de que algunas soluciones incrementan su viscosidad cuando son enfriadas, solidificándose sin formación de cristales [44]. El primer trabajo disponible en la literatura referente a la vitrificación de sistemas vivos fue publicado por

Luyet *et al.* en 1937 cuando demostraron la vitrificación exitosa de espermatozoides de rana [45]. En 1985 se consiguió la vitrificación exitosa de embriones de ratón [46]. La técnica de vitrificación posee numerosas ventajas frente a la congelación lenta: es un procedimiento sencillo que no requiere equipos costosos ni sofisticados, no utiliza protocolos con tasas de enfriamiento bajas que sin el equipamiento correcto son difíciles de cumplir, impide la formación de hielo intracelular y evita la deshidratación excesiva que ocurre en la congelación lenta. Sin embargo, la principal desventaja de esta tecnología radica en la necesidad de utilizar alta concentración de agentes crioprotectores, que si bien permite una mayor penetración de esta sustancia, aumenta las probabilidades de causar daños celulares por causas osmóticas y/o tóxicas [47]. Esto conduce a algunas consideraciones técnicas menos favorables y que hay que tener en cuenta al momento de realizar el procedimiento, vinculadas a una buena destreza del operario en la vitrificación así como a la necesidad de un protocolo de calentamiento en varios pasos, a diferencia de la transferencia directa que se utiliza con la congelación y que es extremadamente simple. Pero en general, más allá de estas consideraciones prácticas, la tasa de sobrevivencia y la tasa de preñez obtenida con la vitrificación es mayor que con la congelación lenta.

La velocidad de enfriamiento es uno de los principales factores que intervienen en el proceso de vitrificación, y ésta depende de la masa térmica de la muestra (capacidad de absorber y retener calor) y de su superficie. Para alcanzar tasas elevadas de enfriamiento, se debe usar un material que tenga baja masa térmica y una relación superficie/volumen elevada. Diferentes estudios han demostrado que una de las maneras más fáciles de incrementar las tasas de enfriamiento es el uso de pequeños volúmenes de soluciones de crioprotectores (*e.g.*, 0,07 μL) [41], y así nacen en los últimos años los métodos de vitrificación de mínimo volumen [43]. Cuando se utiliza nitrógeno líquido para alcanzar tasas de enfriamiento elevadas, la muestra es puesta en contacto directo con el nitrógeno líquido sumergiéndola en él, alcanzándose tasas de enfriamiento de miles de grados Celsius por minuto, dependiendo del contenedor o dispositivo, el volumen, la conductividad térmica, la composición de la solución, entre otros

factores [48]. Además, las tasas de enfriamiento suelen aumentar cuando se utilizan soportes de vitrificación como pajuelas, *open pulled straws* (OPS), gradillas de microscopia electrónica, etc. [49]. En la Figura 1, se puede observar que se necesita una tasa de vitrificación de 80×10^6 °C/min para vitrificar agua pura mientras que esta tasa de enfriamiento disminuye a 20.000 °C/min si se reduce el volumen de la gota en el rango de los 0.1 µl y se aumenta la concentración de crioprotectores a un 30% en la solución de vitrificación, mostrando que es más fácil alcanzar el estado de vitrificación reduciendo el volumen que incrementando las tasas de enfriamiento [50]. Otro factor importante en el proceso de vitrificación es la viscosidad de la solución en la cual los embriones y ovocitos están suspendidos, y su capacidad de transitar por el estado “vítreo” a bajas temperaturas. Esta capacidad es definida por la concentración de los crioprotectores y otras sustancias presentes en el medio. La temperatura a la cual ocurre esta transición es definida como Temperatura de transición vítrea (T_G); cuanto más elevada es la concentración de los agentes crioprotectores más rápido se alcanza la T_G . Por lo tanto una combinación de diferentes crioprotectores es usada en los medios de vitrificación para incrementar la viscosidad de los medios, incrementando la T_G de la solución, reduciéndose la toxicidad. Por ejemplo, en la industria ganadera, para evitar la manipulación de embriones post-calentamiento, se utiliza etilenglicol como crioprotector por ser altamente permeable y con una capacidad de transición elevada [51]. Los métodos de mínimo volumen ampliamente utilizados los últimos años permiten combinar tasas elevadas de enfriamiento y de calentamiento. Estos métodos se pueden dividir en dos categorías, aquellos que utilizan dispositivos donde la muestra biológica (el ovocito) es colocada en una superficie que queda en contacto directo con el nitrógeno líquido, y aquellos donde la muestra es entubada en un dispositivo [52], denominándose sistemas abiertos o cerrados, respectivamente. Cada uno de ellos tiene sus ventajas, en los métodos abiertos donde se utiliza una superficie se puede controlar mejor el volumen de la gota y la tasa de enfriamiento es mayor al entrar en contacto directo con el nitrógeno líquido. Los métodos cerrados han sido propuestos en humanos para evitar riesgos de contaminación de las muestras con posibles agentes patógenos que pueden estar en el nitrógeno líquido. En suma, la combinación de estos tres factores

determinantes en el proceso de vitrificación: tasa de enfriamiento/calentamiento, viscosidad y volumen, permite generar una ecuación que ayuda a determinar la probabilidad de vitrificación conocida como la ecuación de Arav [50].

$$\text{Probabilidad de vitrificación} = \frac{\text{Tasa de enfriamiento/calentamiento} \times \text{Viscosidad}}{\text{Volumen}}$$

Volumen

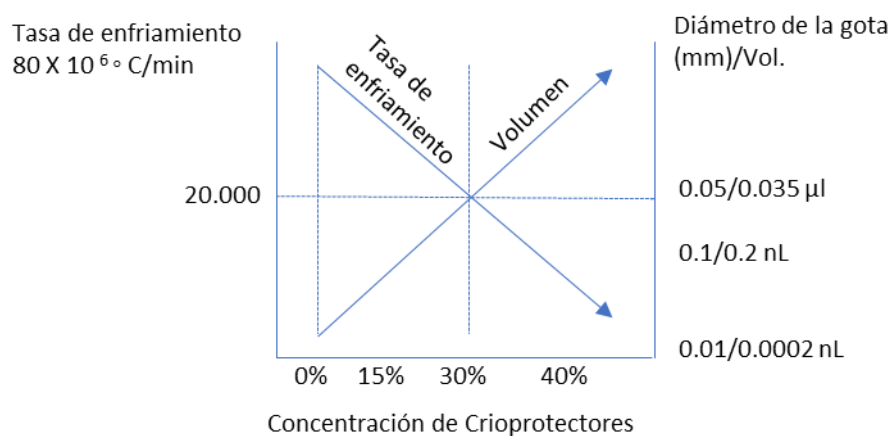


Figura 1. La probabilidad de una vitrificación exitosa depende de la tasa de enfriamiento, volumen y composición de la solución. La probabilidad de vitrificación incrementa a medida que el volumen de la muestra disminuye. Por ejemplo, para una gota de 0,02 μl se necesita aproximadamente 17,5% de agentes crioprotectores. Se puede observar que la mejor forma de conseguir tasas de enfriamientos reales cercanas a los 20.000 $^\circ\text{C/min}$ es disminuyendo el volumen. Los métodos actuales de vitrificación utilizan alrededor de un 30% de crioprotectores en combinación con volúmenes cercanos a los 0,1 μL .

La criopreservación de ovocitos representa un gran desafío para técnicos e investigadores ya que normalmente los ovocitos suelen ser muy sensibles a este proceso, mucho más que los embriones y muchísimo más que los espermatozoides. Por este motivo, la criopreservación de espermatozoides está disponible en el ámbito comercial desde mediados del siglo pasado, la criopreservación de embriones desde hace varias décadas, y la criopreservación de ovocitos está aún en desarrollo en el ámbito científico con resultados que no alcanzan a ser aceptables para ser aplicada a nivel comercial. Las dificultades asociadas al éxito en la criopreservación de ovocitos se deben en parte a sus propiedades intrínsecas tanto estructurales como fisiológicas. Debido a la sensibilidad de los ovocitos a los procesos de enfriamiento, su criopreservación no está bien establecida como en el caso de los espermatozoides y embriones (Woods *et al.*, 2004). En los últimos años, los métodos de vitrificación ultra-rápidos y con mínimo volumen han permitido en algunas especies superar las dificultades asociadas a la criopreservación de ovocitos. Por ejemplo, en humanos el uso del Cryotop que combina pequeños volúmenes de vitrificación ($<0,1 \mu\text{l}$) con elevadas tasas de enfriamiento ($22.800^{\circ}\text{C min}^{-1}$) ha permitido obtener tasas de sobrevivencia superiores al 90%, clivajes superiores al 80% y aproximadamente un 50% de desarrollo al estadio de blastocisto [43]. Este método ha revolucionado el campo de la criopreservación de ovocitos en humanos y desde que surgió hace algunos años es la técnica más utilizada en los laboratorios clínicos de FIV [53]. Sin embargo el uso del método de mínimo volumen y enfriamiento ultrarrápido Cryotop no es frecuente en otras especies. Si bien se han vitrificado ovocitos de diferentes especies de interés productivo como los bovinos [54],[56], ovinos [57], [58] y equinos [59], [60], las tasas de éxito son pobres al compararla con ovocitos humanos [53]. Por ejemplo en ovinos, en el 2007 Succu *et al.* [61], realizaron un estudio donde compararon tres diferentes soportes de vitrificación para criopreservar ovocitos de ovejas en MII. Los CCOs madurados *in vitro* fueron divididos en diferentes grupos experimentales según el tipo de soporte utilizado: open pulled straws, cryoloops y cryotops. Se utilizó como control ovocitos expuestos a las soluciones de vitrificación (sin vitrificar) (EXP), además de un grupo control (CTR) sin vitrificar y sin tratamiento de crioprotectores. Aquellos grupos que fueron vitrificados independientemente del tipo de

soporte utilizado, tuvieron una menor tasa de clivaje que los grupos sin vitrificar (EXP, CTR). Todos los grupos vitrificados mostraron alteraciones en la conformación del huso acromático, el cual se observó ligeramente recuperado después de dos horas de incubación. De manera interesante, en aquellos ovocitos que no fueron vitrificados, la tasa de desarrollo a blastocisto fue notablemente inferior en el grupo que había sido expuesto a las soluciones de vitrificación al compararla con el grupo control sin exposición a estos medios (17% vs. 50%; $P < 0.05$), demostrando que la sola exposición del ovocito a la solución de vitrificación disminuyó su competencia. Seguramente por este motivo, diferentes trabajos han reportado tasas de clivaje y desarrollo a blastocisto muy inferiores respecto a los grupos control sin vitrificar (que tampoco son expuestos a la solución de vitrificación). En los diferentes reportes disponibles en ovinos y bovinos, las tasas de desarrollo pueden variar desde 0% hasta 20% dependiendo del tratamiento y soporte utilizado [41], [62], [63]. Estas diferencias observadas en las tasas de éxito de vitrificación de ovocitos de animales domésticos vs. ovocitos humanos hace que los investigadores se cuestionen acerca de diferencias morfológicas, estructurales y moleculares entre especies, originando resultados muy variables. Entre estas diferencias, el contenido lipídico citoplasmático ha sido motivo de estudio. Los ovocitos acumulan lípidos en forma de gotas citoplasmáticas (del inglés: *lipid droplets*; LD), lugares intracelulares donde las células almacenan lípidos neutros como triglicéridos, esteroides y retinoides [64]. Los ovocitos de animales domésticos presentan la peculiaridad de poseer un alto contenido de lípidos que varía entre especies y que en general es mayor que en humanos, lo que suele disminuir su sobrevivencia a los procesos de enfriamiento [28]. En general, aquellas especies que presentan un mayor contenido de lípidos en el citoplasma de sus ovocitos, presentan menor sobrevivencia a la criopreservación [65]. Por ejemplo, un ovocito inmaduro de cerdo posee aproximadamente 160 ng de ácidos grasos, lo que representa aproximadamente 1,8 veces más que los ovocitos de ovejas y 2.5 más que los ovocitos de vacas [66]. Es así como la reducción del contenido de lípidos de los ovocitos se presenta como una alternativa atractiva para mejorar la vitrificación de ovocitos [28]. Para determinar el

contenido lipídico en forma de gotas citoplasmáticas, el colorante BODIPY 493/503 ha sido utilizado con éxito en ovocitos de ratón [67], bovinos [68], ovinos, suinos y humanos [69].

Una de las formas de delipidar o extraer los lípidos de los ovocitos es remover de forma mecánica las gotas citoplasmáticas [70]. Sin embargo se ha observado que la delipidación mecánica de ovocitos porcinos afecta la tasa de desarrollo a blastocisto [71]. Esto plantea la necesidad de buscar estrategias diferentes que permitan la disminución del contenido de lípidos sin afectar el desarrollo embrionario. Es así como han surgido enfoques farmacológicos que permiten disminuir el contenido de lípidos, inhibiendo la lipogénesis o estimulando la lipólisis [28]. Por ejemplo, el uso de L-carnitina en el medio de cultivo promueve el metabolismo de lípidos, observándose una disminución en la cantidad de gotas lipídicas de blastocistos bovinos mejorando la sobrevida de los embriones poscongelación [65]. Además, se ha reportado su uso en el medio de MIV de ovocitos bovinos [72] y porcinos [73], observándose mejores tasas de maduración y desarrollo embrionario. La restricción de algunos componentes en el medio de maduración (por ejemplo, el uso de medios definidos libres de suero), reducen el contenido de lípidos en ovocitos [74] y en embriones [22], promoviendo la utilización de sus reservas endógenas y mejorando en general la sobrevida a procesos de criopreservación [75]. Sin embargo, la competencia ovocitaria en estos medios generalmente suele ser menor al compararla con medios indefinidos en los que se ha agregado suero [15], [28]. Como ya fue indicado, el agregado de suero contiene lípidos que podrían afectar negativamente la criotolerancia. Por este motivo, la extracción de los lípidos en dicho suero podría mantener el efecto favorable de este componente, evitando el efecto negativo del excesivo aporte lipídico. Esta línea de razonamiento y evidencias asociadas dio lugar a esta tesis.

Estrés en el retículo endoplásmico (RE) de CCOs

El retículo endoplásmico participa en numerosas funciones que regulan la homeostasis celular, incluyendo biosíntesis de lípidos, regulación de calcio y síntesis de nuevas proteínas tanto de membranas

como secretorias [76]. Esta estructura consiste en un compartimiento celular formado por una variedad de moléculas como chaperonas y otras proteínas que regulan la biogénesis, plegamiento, tráfico y degradación de proteínas [77]. A pesar de su elaborada y altamente especializada maquinaria, existe una proporción de proteínas que transitan por el RE que no están apropiadamente formadas. Estas proteínas que no están plegadas correctamente son degradadas vía un sistema denominado degradación asociada al retículo endoplasmático (ERAD), transportándolas hacia el citosol para ser posteriormente degradadas por el proteasoma [78]. Sin embargo, la capacidad del retículo para plegar las proteínas de forma correcta puede verse afectada en diferentes circunstancias, promoviendo la acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas en el lumen de este organelo y originando una disfunción conocida como estrés del RE, lo que activa una respuesta adaptativa denominada respuesta a proteínas desplegadas (del inglés: *Unfolded Protein Response*, UPR). En un principio, esta ruta detiene la traducción de proteínas e incrementa la producción de chaperonas y foldasas involucradas en el plegamiento de proteínas. Sin embargo, si la situación no puede ser resuelta, UPR dirige las células hacia apoptosis [76]. La UPR funciona a través de tres rutas de señalización activadas a través de diferentes receptores: PERK, IRE1- α y ATF6 (Fig. 2), los cuales una vez activados desencadenan una serie de reacciones que permiten restaurar la homeostasis en el RE [79]. La activación de UPR también está reportada en ovocitos. El exceso de ácidos grasos en el medio de cultivo indujo estrés en el RE en ovocitos de ratones, provocando la activación UPR y afectando así la viabilidad del ovocito con el bloqueo de su maduración [67]. Recientemente también se ha reportado la activación de UPR en ovocitos de ratón vitrificados, y además se demostró que su inhibición mejora las tasas de sobrevivencia posdescongelación [80]. Si bien los resultados son escasos, esta información reciente nos permite complementar o formular nuevas hipótesis acerca del mecanismo mediante el cual el contenido lipídico en los ovocitos puede afectar la sobrevivencia a la criopreservación y el posterior desarrollo embrionario.

En suma, los lípidos no sólo son una fuente energética, sino también tienen efecto sobre la biología de las membranas y sobre las interacciones célula-célula, proliferación celular y transporte de biomoléculas [66]. Por lo tanto, mayores estudios referentes al contenido lipídico en los ovocitos son de vital importancia para mejorar la producción de embriones *in vitro*, así como para el avance en los procedimientos de criopreservación.

CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Los sistemas de producción de embriones *in vitro* poseen una tasa de desarrollo embrionario menor a la producción *in vivo*, diferencia que puede atribuirse a una menor competencia ovocitaria. La acumulación excesiva de lípidos en el citoplasma de ovocitos producto de las condiciones de la MIV, puede alterar su metabolismo afectando su capacidad de desarrollo y dificultando la sobrevivencia de los ovocitos a la criopreservación. Particularmente, la presencia de suero en los medios de MIV podría interferir con el contenido lipídico del ovocito. Por este motivo, una mejor comprensión de los mecanismos que asocian la presencia de lípidos con el éxito en la maduración del ovocito es de vital importancia para mejorar la eficiencia de estas tecnologías reproductivas. Se propone abordar este problema mediante el estudio de la extracción de lípidos del suero que habitualmente se utiliza para la elaboración del medio de maduración *in vitro*.

HIPOTESIS

La maduración *in vitro* de los CCOs en un medio delipidado reduce la concentración de gotas lipídicas en el citoplasma de los ovocitos, mejorando la sobrevivencia a la vitrificación y el desarrollo embrionario, respuesta que está vinculada a una reducción en el estrés asociado al retículo endoplásmico.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar si el contenido lipídico en los ovocitos es menor cuando se suplementa el medio de maduración con suero de oveja en estro previamente delipidado, y si esto afecta la competencia ovocitaria, la sobrevivencia a la vitrificación y la producción de embriones *in vitro*.

Objetivos Específicos

- Evaluar si la delipidación del suero de oveja en estro utilizado en la MIV afecta el contenido de lípidos en el citoplasma de ovocitos.
- Estudiar si el uso de suero de oveja en estro completo o delipidado afectan la tasa de clivaje, desarrollo embrionario y la tasa de eclosión.
- Estudiar el efecto del contenido de lípidos en el ovocito sobre la sobrevivencia al proceso de vitrificación y desarrollo embrionario.
- Determinar la expresión de genes asociada al estrés en el retículo endoplásmico en ovocitos madurados *in vitro* bajo diferentes condiciones lipídicas y sometidos a vitrificación.

ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

Esta tesis consiste en tres experimentos que se realizaron en la Fundación IRAUy y en la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) del Instituto Pasteur de Montevideo. En la Fig. 2 se puede observar la representación esquemática de los tres experimentos. En total se utilizaron 2.986 CCOs obtenidos de ovarios de oveja colectados en frigorífico que fueron asignados a diferentes grupos experimentales. A menos que se indique lo contrario, los químicos empleados para la elaboración de medios fueron adquiridos en Sigma (St. Louis, MO, EEUU).

Experimento 1: Maduración en suero delipidado

El objetivo fue evaluar el efecto de utilizar medio de MIV suplementado con suero de oveja en estro completo o delipidado, sobre la cantidad de gotas lipídicas citoplasmáticas y la competencia ovocitaria. Para ello, 866 CCOs fueron madurados *in vitro* en medio específico suplementado con suero de oveja en estro completo (Grupo Control, n= 452) o suero de oveja en estro delipidado (Grupo Delipidado, n=414). Los lípidos neutros contenidos en las gotas lipídicas de los CCOs parcialmente desnudados, la tasa de clivaje, tasa de desarrollo al Día 6, tasa de desarrollo al Día 8, y la tasa de eclosión fueron comparada entre los grupos. Un total de siete réplicas fueron realizadas para cada grupo de tratamiento.

Experimento 2: Delipidación en MIV y vitrificación de ovocitos

El objetivo fue determinar si la maduración con suero completo o delipidado afecta la sobrevivencia a la vitrificación de ovocitos. En total 1.280 CCOs fueron madurados *in vitro* en suero de oveja en estro completo o delipidado. Una vez finalizada la MIV, los CCOs fueron vitrificados conformando un diseño 2 x 2 factorial (Grupo Control + vitrificación, n=288, Grupo Delipidado + vitrificación, n=291) o no (Grupo Control, n= 344, Grupo Delipidado, n=357). El contenido de gotas

lipídicas en los ovocitos madurados fue evaluado antes y después del proceso de vitrificación/calentamiento. Se determinó la tasa de clivaje, la tasa de desarrollo embrionario (Día 6), tasa de desarrollo Día 8, y la tasa de eclosión en los cuatro grupos. Un total de 13 réplicas fueron procesadas para cada grupo experimental.

Experimento 3: Estrés en el RE asociado a MIV y vitrificación de ovocitos.

El objetivo fue determinar si la maduración de los CCOs bajo diferentes condiciones lipídicas y su posterior vitrificación se asocia a la expresión de genes vinculados al estrés en el retículo endoplásmico. Un total de 840 CCOs fueron usados para la determinación de los genes *ATF4*, *ATF6*, *GRP78* y *CHOP* por PCR cuantitativa en cinco grupos experimentales (Inmaduros, Grupo Suero Completo Control, Grupo Delipidado, Grupo Suero Completo Control + vitrificación, Grupo Delipidado + vitrificación). Para realizar este diseño, los CCOs viables fueron madurados *in vitro* en medio específico suplementado con suero de oveja en estro completo o delipidado. Una vez madurados, la mitad de los ovocitos en cada grupo fueron vitrificados y calentados, y la otra mitad continuó el proceso sin criopreservación. Finalmente, para la determinación de los transcriptos se procedió a realizar *pool* de 30-35 CCOs por grupo experimental, los que fueron congelados directamente en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta el momento de su uso. Previo a la MIV un grupo de 30 ovocitos inmaduros viables fue almacenado a -80 °C para el mismo análisis. En total se realizaron siete réplicas de este experimento manteniendo todos los grupos experimentales.

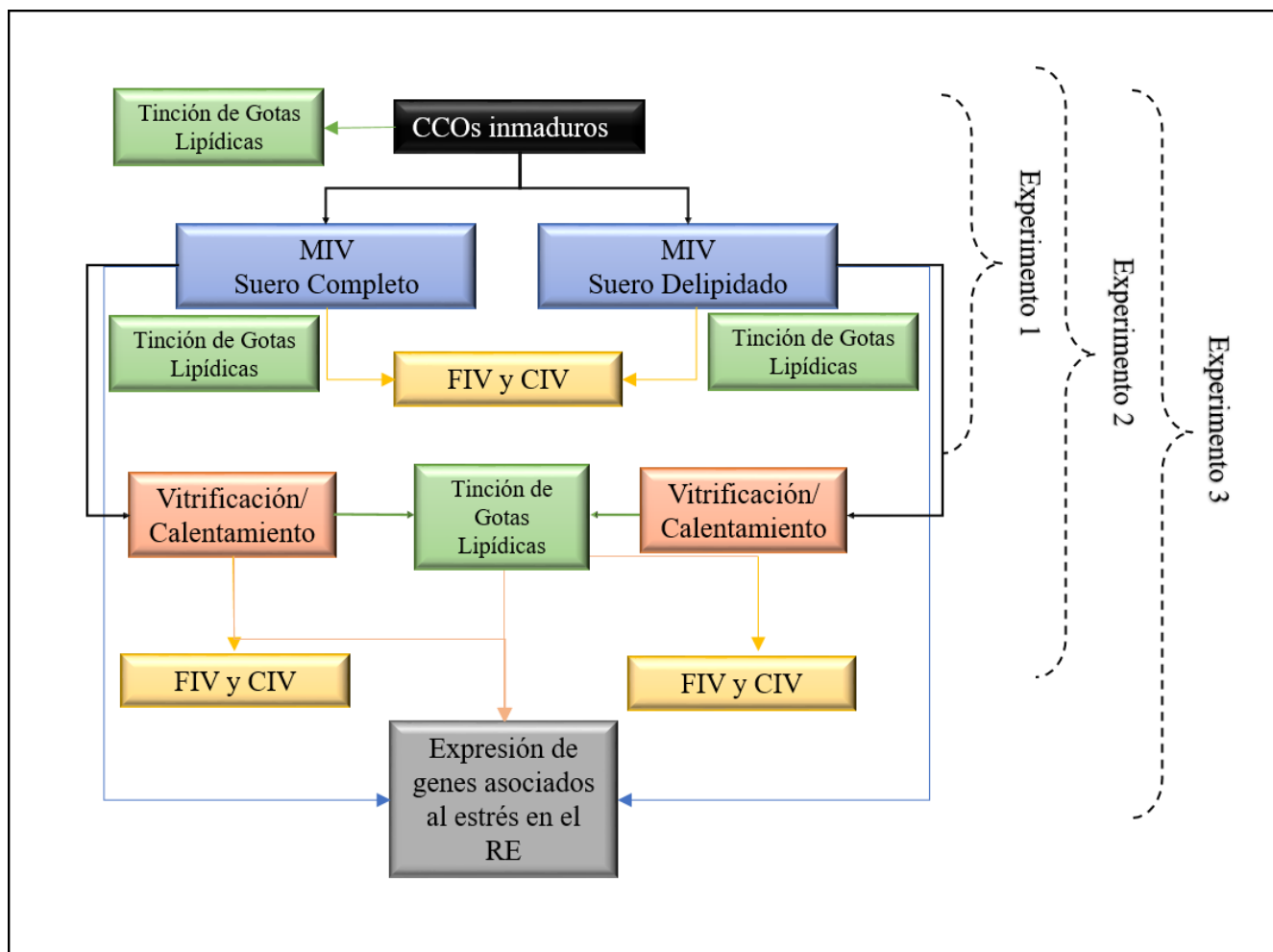


Figura 2. Representación esquemática del diseño experimental. Determinación del efecto de la suplementación del medio de MIV con suero de oveja en estro completo (Grupo Control) vs. delipidado sobre: a) el contenido de lípidos en ovocitos y el desarrollo embrionario (Experimento 1), b) la sobrevivencia post-vitrificación (Experimento 2), y c) la expresión de genes asociados al estrés en el retículo endoplasmático (RE) (Experimento 3).

MATERIALES Y METODOS

Producción de Suero de Oveja en estro, delipidación y determinación de lípidos.

El suero de oveja en estro fue obtenido de ovejas cuyo estro fue sincronizado utilizando un protocolo con progestágenos y gonadotrofina coriónica equina previamente validado [81]. A las ovejas en estro se le colectó 50 ml de sangre, se esperó a la formación del coágulo a temperatura ambiente durante 30 min, y las muestras fueron centrifugadas a 1500 g durante 20 min a 4°C. El suero fue colectado e inactivado a 56 °C por 30 min. La mitad del suero obtenido fue mantenido entero o completo, mientras que la otra mitad fue sometida a la extracción de lípidos utilizando el reactivo comercial Cleanascite™ (Biotech Support Group), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Brevemente, 1 ml de reactivo se mezcló con 4 ml de suero (1:4), agitándolo durante 10 min para asegurar una mezcla homogénea. A continuación, se procedió a su incubación por 1 hora a 4 °C, una vez finalizado el tiempo de incubación la muestra fue centrifugada a 1000 g por 15 min. Los sobrenadantes fueron colectados, mezclados homogéneamente y filtrados utilizando un filtro de jeringa de 0.22 µm. Cinco alícuotas de cada grupo (5 muestras de cada grupo del mismo lote) fueron analizadas por el Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República para triglicéridos, colesterol total y ácidos grasos no esterificados (AGNE), utilizándose los kits comerciales TG color GPO/PAP AA, Colestat enzimático (Wiener Lab, Argentina) y NEFA-HR (2) (Wako Chemicals USA, Inc., Richmond, VA) respectivamente. Todos los ensayos fueron realizados según las instrucciones del fabricante y las medidas fueron tomadas con un multi-analizador bioquímico (Vitalab Selectra-2 Merck, Germany). La eficiencia promedio de remoción de los lípidos fue del 54,4% para el colesterol total, 21,2% para triglicéridos y 30,6% para AGNE. Los valores promedios obtenidos, así como los coeficientes de variación (CV) analíticos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Contenido de lípidos del suero de oveja en estro completo o delipidado (previo a ser agregado al medio de maduración).

	Suero completo (mmol/L)	CV (%)	Suero delipidado (mmol/L)	CV (%)
Triglicéridos	0,283 ± 0,01	5,150	0,223 ± 0,001	11,2236
Colesterol total	1,80 ± 0,00	0,000	0,820 ± 0,007	6,061
Ácidos grasos no esterificados	0,718 ± 0,003	7,223	0,498 ± 0,017	3,433

Medias ± DS de 5 muestras de un mismo lote.

Colecta ovárica y obtención de los CCOs

Ovarios de ovejas fueron obtenidos en el frigorífico y transportados al laboratorio en solución salina suplementada con 50 UI/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina a una temperatura de 35 – 37 °C en recipiente térmico. Entre las 2 a 4 horas postmortem, los CCOs fueron aspirados de todos los folículos de 2 a 6 mm de diámetro utilizando una jeringa con émbolo de plástico y una aguja (21G) conteniendo medio de recuperación que consistió en TCM199 suplementado con 5 UI/ml de heparina, 50 UI/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, y 0,3% de albumina sérica bovina (BSA) libre de ácidos grasos. El líquido de colecta fue observado bajo lupa estereoscópica (SZ 61, Olympus, FL, USA) a 40x y los CCOs fueron trasladados a medio de lavado que consistió en TCM 199-HEPES suplementado con 50UI/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina y 0,3% de BSA. Los CCOs fueron clasificados morfológicamente; aquellos ovocitos que presentaron un citoplasma homogéneo con granulaciones finas y rodeados por dos o más capas de células de cúmulos (ovocitos grado A) y aquellos parcialmente rodeados por células del cúmulos con citoplasma homogéneo (ovocitos grado B) fueron utilizados para la MIV, los ovocitos desprovistos de células del cúmulos (grado C) y rodeados de fibrina o células del cúmulos posmaduras fueron descartados (grado D).

Maduración *in vitro* (MIV)

Los ovocitos seleccionados fueron madurados *in vitro* siguiendo el protocolo de rutina de nuestro laboratorio [5]. Brevemente, los CCOs fueron lavados tres veces en medio de lavado y colocados en grupos de 25 a 30 CCOs en gotas de 100 µl de medio de maduración cubiertas con aceite mineral, por 24 h a 39°C en una atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂. El medio de MIV fue suplementado con 10% de suero de oveja en estro completo (Grupo Control) o delipidado (Grupo Delipidado), 10 µg/ml FSH, 10 µg/ml LH, 100 µM cisteamina, 50 UI/ml de penicilina 50 µg/ml de estreptomicina.

Fertilización *in vitro* (FIV)

Para la FIV se utilizó semen de un único carnero que había sido criopreservado en pajuelas de 0,25 ml a -196°C en nitrógeno líquido siguiendo el protocolo de congelación utilizado comercialmente en el Centro IRAUy. Brevemente, el semen es colectado mediante vagina artificial, se evalúa motilidad, morfología y concentración. Se ajusta la concentración a $70 \times 10^6/\text{ml}$. A continuación, el crioprotector Triadyl (Minitube-Alemania), suplementado con yema de huevo (20%) es agregado en una relación 1:1 de forma gradual y con agitación para evitar shock osmótico. El descenso de temperatura es realizado a razón de $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$. El llenado de las pajuelas se hace de forma automática utilizando una llenadora automática MPP1 (Minitube-Alemania). Las pajuelas son impresas con el nombre, número de registro, raza del carnero y la fecha de colecta para su identificación. Finalmente, la congelación se realiza sobre vapores de nitrógeno durante 10 minutos y luego va directamente al nitrógeno líquido.

El día de la FIV (Día 0), una pajuela fue descongelada en un baño maría a 37°C por 30 seg. La técnica de selección espermática utilizada fue la técnica de *swim up*, la cual se basa en el movimiento activo de los espermatozoides desde el fondo del tubo de ensayo hacia la superficie del medio de cultivo de FIV. Se colocaron 200 μl del semen previamente descongelado en el fondo del tubo de centrifuga con 1 ml del medio SOF (del inglés: *Synthetic Oviduct Fluid*) suplementado con 2% de suero de oveja en estro, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ heparina y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hipotaurina (medio FIV). Posteriormente, el tubo fue incubado en una atmósfera de 5% de CO_2 a una temperatura de 39°C en ángulo de 45° por 15 min, permitiendo que los espermatozoides migraran hacia el medio de FIV. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se recuperó el sobrenadante y se determinó la motilidad y concentración espermática en cámara de Neubauer. Los CCOs fueron lavados en gotas de medio FIV y colocados en gotas de 100 μl del mismo medio y cubiertas con aceite mineral, para ser inseminados con una dosis de 1×10^6 espermatozoides totales por gota. Los ovocitos y los espermatozoides fueron incubados por 22 h a 39°C en una atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO_2 .

Cultivo *in vitro* (CIV)

Al finalizar la FIV los presuntos cigotos fueron lavados en medio de cultivo (SOFaa) suplementado con 5% de aminoácidos esenciales, 2,5% de aminoácidos no esenciales y 4 mg/ml de BSA (medio CIV). Las células del cúmulo y restos de espermatozoides fueron removidas mediante pipeteo continuo. A continuación, se procedió a colocar los cigotos en gotas de 100 µl de medio CIV (máximo 30/gota) bajo aceite mineral. Las placas fueron incubadas en una cámara de tri-gaseado (5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂) a 39°C. La tasa de clivaje al Día 2 (número de embriones con ≥ 2 células), tasa de desarrollo al Día 6 (número de mórulas y blastocistos), y al Día 8 (número de blastocistos) fueron determinadas utilizando como denominador el número de estructuras al inicio de la MIV. La tasa de eclosión al Día 8 fue calculada utilizando el número de blastocistos eclosionados sobre el total de número de blastocistos al mismo día.

Vitrificación de ovocitos por el método Cryotop.

La vitrificación de los ovocitos se realizó utilizando el método Cryotop [43]. Esta técnica fue realizada siguiendo la metodología y los medios reportados previamente por nuestro grupo para embriones ovinos [82], [83]. A las 22 horas post-MIV los ovocitos fueron parcialmente desnudados usando 0.1 mg/ml de hialuronidasa, para ellos se procedió a una incubación breve de 30 s a 37 °C seguido de pipeteo constante. Sucesivamente se realizaron tres lavados en medio de lavado con el fin de evitar la acción prolongada de la enzima. Los CCOs parcialmente desnudados fueron equilibrados por 15 min en 300 µl de una solución de equilibrio (ES) compuesta por etilenglicol (EG) (7,5%), dimetilsulfóxido (DMSO) (7,5%) preparada en una solución base (SB) de TCM Hepes 199 suplementada con 20% de suero bovino fetal (SBF). A continuación, los ovocitos fueron transferidos a 300 µl de la solución de vitrificación (VS: EG (15%), DMSO (15%), y sacarosa (0,5M) en TCM Hepes 199, 20% SBF) donde fueron lavados tres veces en un tiempo no mayor a 60 s. Inmediatamente, fueron colocados en 300 µl de

medio VS nuevo y se procedió a realizar dos lavados en un tiempo no mayor a 30 s. Finalmente, los ovocitos (4 por dispositivo) fueron cargados en la punta de la pipeta y colocados en la lámina del Cryotop con el mínimo volumen posible ($<0.1\mu\text{l}$), para ser sumergidos directamente en NL. Los ovocitos vitrificados fueron calentados en el mismo día, el protocolo de calentamiento consistió en sumergir rápidamente la lámina de Cryotop en solución de calentamiento (SC: 1M sacarosa en TCM Hepes 199 suplementada con 20% SBF) a 37°C por 1 minuto. A continuación, los ovocitos fueron colocados por 3 min en una solución de dilución (SD) que contenía 0,5 M sacarosa en TCM Hepes 199 con 20% SBF. Finalmente, los ovocitos fueron transferidos a una primera solución de lavado (SL: TCM 199 con 20% SBF) por 5 min y finalmente se realizó un último lavado por 1 min. Los ovocitos fueron colocados en el medio de MIV a 39°C en 5% CO₂ por 2 horas antes de proceder a la FIV con la finalidad de favorecer la repolimerización de los microtúbulos [84].

Tinción de gotas lipídicas

La tinción de las gotas lipídicas se realizó siguiendo el método descrito por Aardema *et al.* (2011) con ligeras modificaciones [68]. Los CCOs fueron parcialmente desnudados utilizando una incubación breve en 0.1 mg/ml de hialuronidasa a 37 °C por 30 seg y lavados tres veces en una solución de fosfato salino-polyvinylpyrrolidona (PVP-PBS: 0,2% p/v). Los CCOs fueron fijados en 4% de paraformaldehído (PFA) a 37 °C por 1 hora. Una vez fijados se procedió a realizar dos lavados en PVP-PBS. A continuación, los ovocitos fueron permeabilizados por 30 min en PBS con 0,1% (w/v) saponina y 0,1 M glicina (PBS-S). El ADN fue teñido utilizando 10 µg/ml de TO-PRO-3 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) por 20 min y posteriormente se realizaron dos lavados en PBS-S. La tinción de las gotas lipídicas fue realizada con el colorante BODIPY 493/503 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) diluido en PBS (20 µg/ml) por 1 hora en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente los ovocitos fueron lavados tres veces en PVP-PBS para finalmente ser montados en portaobjetos y cubiertos con 80% de glicerol.

Medición del contenido de gotas lipídicas en el citoplasma de ovocitos.

Las imágenes de los ovocitos fueron tomadas utilizando un microscopio confocal laser de barrido (Modelo LSM 800; Zeiss, Thornwood, NY, EEUU) en combinación con un microscopio invertido (Model AxioObserver Z1; Zeiss, Thornwood, NY, EEUU) a 25X. Los colorantes BODIPY 493/503 y TO-PRO-3 fueron excitados con láser de diodo de 488 nm y 640 nm respectivamente. La luz emitida fue filtrada en las siguientes longitudes de onda 410-617 nm para BODIPY y 645-700 nm para TOPRO-3. Las imágenes fueron reconstruidas utilizando el software ZEN 2.1 (*Blue edition*). La cantidad relativa de fluorescencia en el citoplasma del ovocito fue determinada seleccionando el área del ooplasma de cada ovocito parcialmente desnudo. La cantidad relativa de fluorescencia fue calculada por área (μm^2) usando el software ImageJ v.1.44g.

PCR cuantitativa

Para aislar el ARN se utilizaron entre 30-35 CCOs desnudos de cada grupo, por réplica experimental (Inmaduros, Grupo Control, Grupo Delipidado, Grupo Control + vitrificación, Grupo Delipidado + vitrificación). Los CCOs fueron parcialmente desnudos como se describió anteriormente, lavados en PBS y colocados en un tubo de 1,5ml con el menor volumen de PBS posible. Los tubos fueron sumergidos en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta el día de la extracción del ARN. Para la extracción del ARN total se utilizó el kit comercial RNeasy Plus Micro Kit (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante. La concentración de las muestras de ARN fue determinada usando un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA). La pureza de las muestras fue determinada por la relación de las absorbancias 260/280 nm con valores esperados entre 1,8 y 2,0. Para cada muestra, se sintetizó ADN copia (ADNc) mediante transcripción reversa usando 50 ng del ARN total como molde y la enzima *SuperScript®III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen) con hexámeros al azar, en un volumen final de reacción de 10 μl . La reacción fue llevada a cabo en un termociclador a 25°C por 5 min

(*annealing*), seguido de un ciclo de extensión a 50 °C por 50 min para finalmente ser inactivada a 85°C por 5 min.

Se determinó la expresión génica mediante PCR en tiempo real o cuantitativo (qPCR). Los *primers* fueron diseñados para *GRP78*, *CHOP*, *ATF4*, y *ATF6* usando NCBI Primer Blast. La secuencia de los cebadores *PPIA* y *TUBB* fue tomada de reportes previamente publicados para ovocitos ovinos [85]. El tamaño de los fragmentos amplificados, así como el número de acceso de la secuencia en *GenBank* son listados en la tabla 2. Todos los *primers* fueron sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA). La reacción final de PCR fue compuesta por 5 µl de SYBR Green PCR Mix (2X) (Applied Biosystems, UK), 2µl de agua libre de nucleasas, 1 µl de cada *primer* (10 µM), y 1 µl de ADNc para un volumen final de 10 µl. Las muestras fueron amplificadas en un Eco™ Real-time PCR (Illumina, San Diego, USA). El programa de amplificación consistió en un paso de activación de la enzima a 95°C por 10 min, seguido de 45 ciclos de PCR. Cada ciclo consistió en una etapa de desnaturalización a 95 °C por 15 seg, seguido de un paso de alineación y extensión a 60 °C por 60 seg y un paso de disociación a 95 °C por 15 seg y 60 °C por 15 seg. Finalmente, la reacción se finalizó a 95 °C por 15 seg. Al finalizar la corrida se realizó el análisis de las temperaturas de *melting* para confirmar la integridad y especificidad de los productos amplificados. Todas las muestras fueron corridas en duplicado y los valores promedio fueron utilizados para los cálculos sucesivos. Para cada gen estudiado se realizó una curva estándar para calcular las eficiencias (E) utilizando la formula $\% E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ [86]. La expresión génica fue medida por cuantificación relativa al grupo calibrador (Grupo Control) y normalizada a la media geométrica de los genes de control endógeno (*TUBB* y *PPIA*), tomando en consideración las eficiencias de amplificación respectivas.

Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el Software Infostat (Córdoba, Argentina). Los datos expresados como porcentaje fueron transformados por arcoseno y expresados como media $\pm$ error standard (SEM). Para determinar si la muestra seguía una distribución normal se realizó el test de Shapiro-Wilkm. Para variables que siguieron una distribución normal se realizó el test de Tukey para determinar diferencias entre grupos (Experimento 1). Aquellas variables no paramétricas fueron analizadas por test de Kruskal-Wallis. Para el Experimento 2 y 3 que siguen un modelo experimental 2x2, los resultados obtenidos fueron analizados utilizando los Modelos Lineales Generalizados y Mixtos considerando como efecto fijo a la criopreservación (vitricificación o frescos), tipo de suero (completo o delipidado) y su interacción, y las réplicas experimentales fueron consideradas como efectos aleatorios (13 réplicas para Experimento 2 y 7 réplicas para el Experimento 3). El nivel de significancia estadística se fijó en $P < 0,05$.

Tabla 2. *Primers* usados en la PCR cuantitativa.

Gen	Nombre del Gen	Secuencia	Tamaño del producto (pb)	Nº Acceso GenBank
<i>PPIA</i>	Peptidylprolyl isomerasa A	F: ATTTATGTGCCAGGGTGGTG R: ACTGGGAACCATTGTGTTGG	158	AY251270
<i>TUBB</i>	Beta-tubulin	F: CAGAGCAAGAACAGCAGCTACTT R:GTGAACTCCATCTCGTCCATGCCCTC	228	AF035420
<i>ATF4</i>	Activating Transcription Factor 4	F: CGAGGTGTTTGTGGGGGACT R: AGGAGCCTGCCTTAGCCTTG	149	GAAI01000637.1
<i>ATF6</i>	Activating Transcription Factor 6	F: GCTCTCTCAGCCTACCGTGG R: CACAGGGGCTGGTACCACAT	130	AY942654.1
<i>GRP78 (HSPA5)</i>	Glucose regulated protein-78	F: AGCCCTATAGCTGCCTGCTG R: CCACGTCCTCCTTCTTGTCC	131	DQ029323.1
<i>CHOP (DDIT3)</i>	C/EBP homologous protein	F: TGGAAGCCTGGTATGAGGAC R: GAGAGGCAGGGTCAAGAGTG	126	AY943948.1

F, *forward primer*; R, *reverser primer*

Tamaño del producto amplificado en pares de bases (pb)

RESULTADOS

Experimento 1

La Fig. 3 muestra los resultados de la localización y cuantificación de las gotas lipídicas por tinción con el colorante BODIPY 493/503 en los ovocitos inmaduros, y en los grupos de CCOs madurados *in vitro* en medio de maduración completo (control) o delipidado. Los ovocitos inmaduros mostraron valores de intensidad comparables al grupo delipidado ($9,9 \pm 2,9$). La intensidad media de fluorescencia de los ovocitos madurados en medio suplementado con suero completo fue significativamente mayor que el grupo de ovocitos madurados en medio delipidado ($22,8 \pm 5,0$ vs. $7,6 \pm 1,7$). Las diferencias observadas en el contenido de lípidos de los ovocitos no tuvieron influencia sobre el desarrollo embrionario (Tabla 3). No se observaron diferencias significativas ($P=NS$) en el clivaje, tasa de desarrollo embrionario al Día 6, tasa de desarrollo al Día 8 y tasa de eclosión, entre los grupos estudiados.

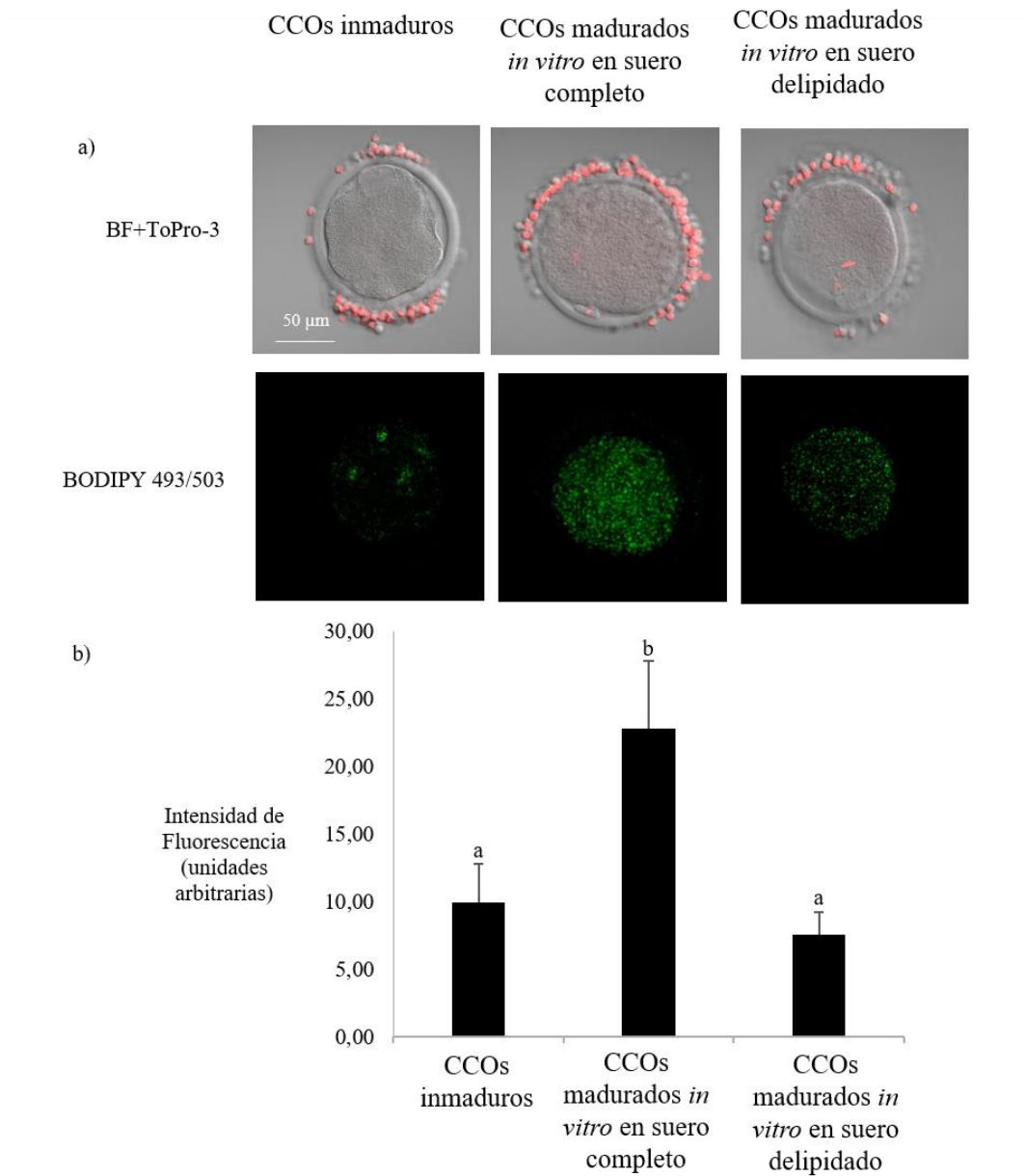


Figura 3. Cuantificación de lípidos en CCOs parcialmente desnudos, madurados *in vitro* con medio de MIV suplementado con suero de oveja en estro completo (Grupo control) o delipidado (Grupo delipidado) (Experimento 1). a). Los núcleos fueron teñidos con ToPro-3 (rojo) y las imágenes obtenidas fueron superpuestas con su imagen correspondiente en campo claro. Las gotas lipídicas teñidas con BODIPY 493/503 (verde) se observaron en mayor concentración después de la MIV en medio suplementado con suero completo (grupo control). b) Contenido de lípidos expresado en unidades arbitrarias de fluorescencia en ovocitos inmaduros (n= 23) y CCOs madurados en medio suplementado con suero completo (Grupo Control, n= 24) o suero delipidado (Grupo Delipidado, n= 24). Los valores son expresados como promedio de la intensidad de fluorescencia de BODIPY por área de ooplasma $\pm$ SEM. a vs b indican diferencias significativas (P<0.05)

Tabla 3. Desarrollo de embriones ovinos producidos *in vitro* con CCOs madurados en medio suplementado con suero de oveja en estro completo o delipidado (Experimento 1, siete réplicas).

	Ovocitos (n)	Clivaje al Día 2 (%)	Mórulas y Blastocistos al Día 6 (%)	Blastocisto al Día 8 (%)	Tasa de eclosión al Día 8 (%)
Suero Completo (control)	452	69,1 ± 7,3	33,4 ± 4,9	27,0% ± 6,9	44,6 ± 9,9
Suero Delipidado	414	70,8 ± 7,3	31,9 ± 4,2	29,8 ± 6,2	50,4 ± 13,2

P=NS.

Experimento 2

El contenido de gotas lipídicas de los ovocitos antes y después de la vitrificación se muestra en la Fig. 4. Las gotas lipídicas se volvieron más pequeñas y menos fluorescentes después de la vitrificación de los ovocitos madurados en medio completo o delipidado. Sin importar el medio utilizado en la MIV, los ovocitos vitrificados (efecto principal: vitrificación vs. no vitrificación) mostraron menor competencia ovocitaria después de la fertilización *in vitro* y del cultivo embrionario, observándose menores tasas de clivaje y desarrollo embrionario al Día 6 y Día 8, así como menor tasa de eclosión al comparar los grupos con los ovocitos que no fueron vitrificados ($P < 0,05$). No se observaron diferencias significativas ($P = NS$) entre los grupos frescos (sin vitrificar), resultado similar a lo obtenido en el Experimento 1 (efecto suero: completo vs. delipidado). No se observó interacción ente el efecto de la vitrificación y el tipo de suero utilizado en la MIV sobre el clivaje, desarrollo embrionario y tasa de eclosión ($P = NS$) (Tabla 4).

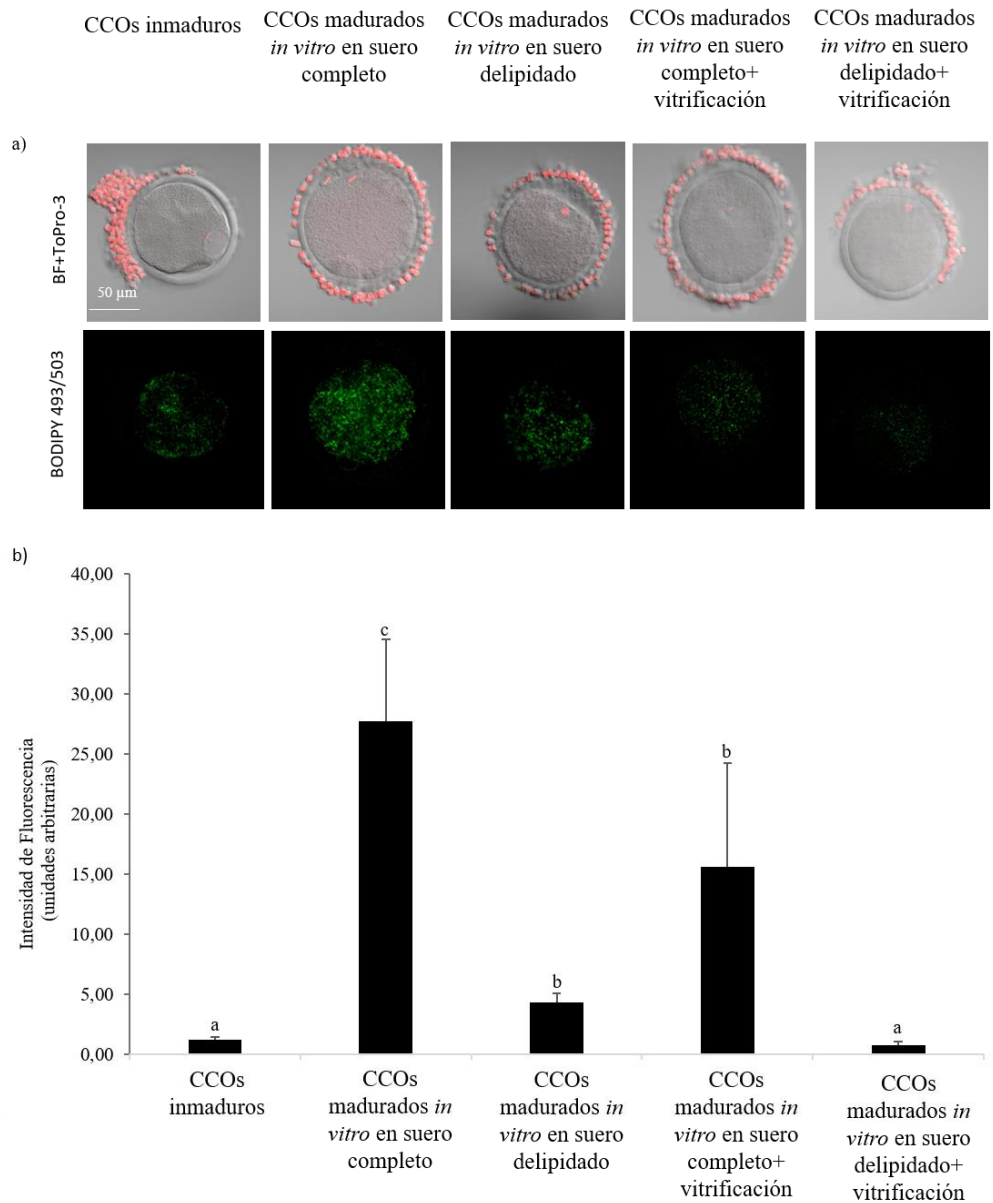


Figura 4. Efecto de la vitrificación sobre la cuantificación de las gotas lipídicas en CCOs madurados *in vitro* en diferentes condiciones lipídicas (Experimento 2). Los núcleos fueron teñidos con ToPro-3 (rojo) y las imágenes obtenidas fueron superpuestas con su imagen correspondiente en campo claro., a) La tinción de los lípidos neutros con BODIPY 493/503 (verde) evidenció una disminución en el número de gotas lipídicas en el grupo de ovocitos vitrificados. b) Contenido de lípidos expresado en unidades arbitrarias de fluorescencia en ovocitos inmaduros (n= 12), CCOs madurados *in vitro* en medio suplementado con suero completo (grupo control, n= 16) o suero delipidado (n= 19) y CCOs vitrificados post-MIV (Completo + vitrificación, n=12; Delipidado + vitrificación, n= 11), Los valores son expresados como promedio de la intensidad de fluorescencia de BODIPY por área de ooplasma $\pm$ SEM. Letras diferentes difieren significativamente ($P < 0,05$).

Tabla 4. Desarrollo de embriones ovinos producidos *in vitro* con CCOs madurados en medio suplementado con suero de oveja en estro completo o delipidado y posteriormente vitrificados (Experimento 2, trece réplicas).

	Ovocitos (n)	Clivaje al Día 2 (%)	Mórulas y Blastocistos al Día 6 (%)	Blastocisto al Día 8 (%)	Tasa de eclosión al Día 8 (%)
Efecto principal					
Suero completo (control)	632	53,3 ± 6,3 ^a	34,7 ± 4,6 ^a	22,4 ± 4,5 ^a	24,6 ± 6 ^a
Suero delipidado	648	54,6,2 ± 6,2 ^a	34,6 ± 4,4 ^a	21,9 ± 4,3 ^a	29,2 ± 6,5 ^a
Efecto principal					
Sin vitrificar	579	80,3 ± 2,9 ^a	53,8 ± 2,4 ^a	41,71% ± 2,6 ^a	48,68 ± 4,9 ^a
Vitrificados	701	27,2 ± 3,6 ^b	15,5 ± 2,4 ^b	2,7% ± 0,9 ^b	5,1 ± 4,0 ^b
Interacción					
Suero*vitrificación		NS	NS	NS	NS
	Ovocitos (n)	Clivaje al Día 2 (%)	Mórulas y Blastocistos al Día 6 (%)	Blastocisto al Día 8 (%)	Tasa de eclosión al Día 8 (%)
Efecto principal					
Suero completo (control)	632	53,3 ± 6,3 ^a	34,7 ± 4,6 ^a	22,4 ± 4,5 ^a	24,6 ± 6 ^a
Suero delipidado	648	54,6,2 ± 6,2 ^a	34,6 ± 4,4 ^a	21,9 ± 4,3 ^a	29,2 ± 6,5 ^a
Efecto principal					
Sin vitrificar	579	80,3 ± 2,9 ^a	53,8 ± 2,4 ^a	41,71% ± 2,6 ^a	48,68 ± 4,9 ^a
Vitrificados	701	27,2 ± 3,6 ^b	15,5 ± 2,4 ^b	2,7% ± 0,9 ^b	5,1 ± 4,0 ^b
Interacción					
Suero*vitrificación		NS	NS	NS	NS

Para la misma columna, a vs b difieren significativamente ($P < 0,05$)

Experimento 3

Los resultados del Experimento 3 mostraron que la expresión de los genes asociados al estrés en el RE fue afectada por el contenido lipídico del suero usado en el medio de MIV y por el proceso de vitrificación/calentamiento, observándose interacción entre ambos efectos principales ($P < 0,05$). Los niveles de expresión relativa de los genes *ATF4*, *ATF6*, *GRP78*, y *CHOP* evaluada en los CCOs expuestos al medio de MIV suplementado con suero completo (Grupo control) o con suero delipidado (Grupo delipidado) y posteriormente vitrificados o no, se muestran en la Fig. 5. Los CCOs madurados en el suero delipidado y subsecuentemente vitrificados aumentaron los niveles de expresión de *ATF4* (4,4 veces) *ATF6* (4,0 veces), *GRP78* (3,6 veces) y *CHOP* (2,5 veces) comparado con los CCOs madurados en medio suplementado con suero de oveja en estro completo sin vitrificar (Grupo calibrador). No se observaron diferencias significativas ($P = NS$) en los niveles de expresión de los genes estudiados en CCOs madurados en suero completo y posteriormente vitrificados (grupo completo + vitrificación). Los CCOs madurados en el suero de oveja en estro delipidado (grupo delipidado, sin vitrificar) mostraron niveles de expresión comparables al grupo control (Grupo Completo). Los resultados evidencian que la vitrificación induce la expresión de los genes asociados al estrés en el RE cuando los CCOs son madurados en un medio reducido en lípidos.

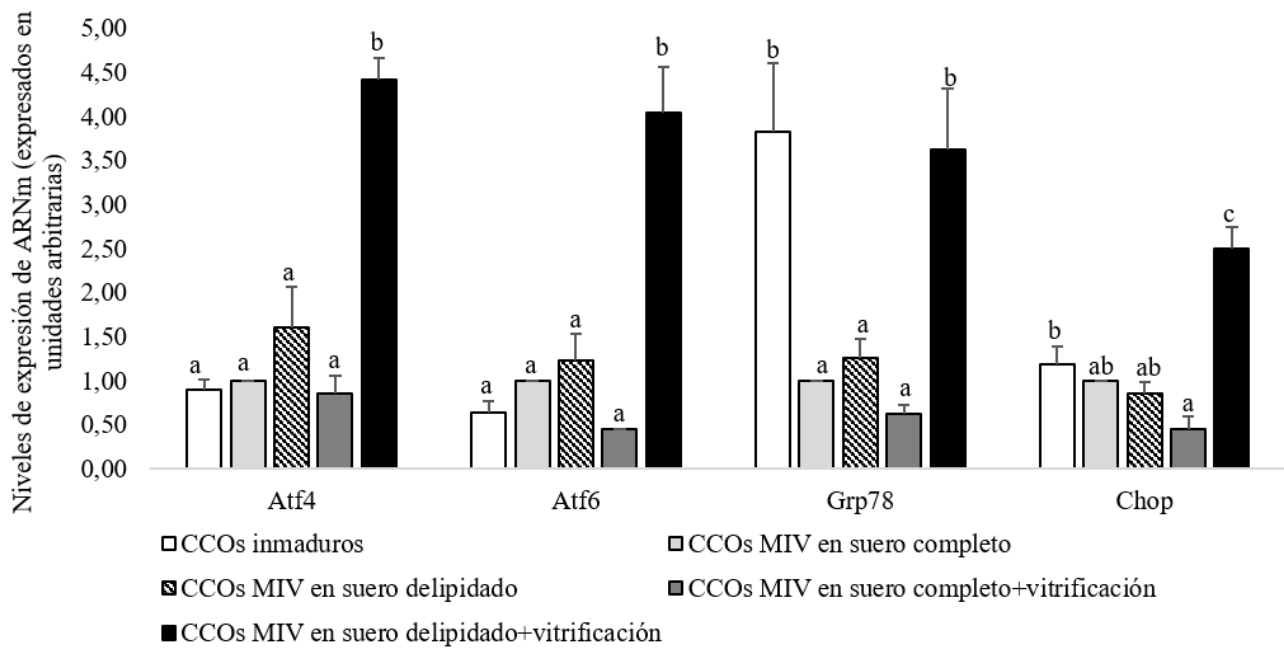


Figura 5. Expresión de los genes asociados al estrés en el retículo endoplásmico de los CCOs madurados *in vitro* en medio suplementado con suero de oveja en suero completo o delipidado y posteriormente vitrificados. El ARN total fue extraído de CCOs previamente denudados, la expresión de los marcadores asociados al estrés en RE (*ATF4*, *GRP78*, *ATF6* y *CHOP*) fue determinada por PCR cuantitativo. Niveles de expresión en 5 grupos experimentales, se observó interacción entre los CCOs madurados en medio suplementado con suero delipidado y subsecuentemente vitrificados. Los valores son expresados en niveles de expresión relativa de ARNm respecto al grupo calibrador (Grupo control) en unidades arbitrarias $\pm$ SEM. Para un mismo gen, letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

DISCUSIÓN

Parte de la hipótesis de esta tesis fue que los CCOs madurados *in vitro* en medio suplementado con suero de oveja en suero previamente delipidado contienen menos gotas lipídicas que los ovocitos madurados con suero completo (sin delipidar). Los resultados confirman la hipótesis planteada, sin embargo las diferencias encontradas no afectaron la competencia ovocitaria ni el proceso de producción de embriones *in vitro*, tanto de los grupos frescos como de los grupos vitrificados. Por otra parte, el proceso de vitrificación de los ovocitos madurados *in vitro* afectó la competencia ovocitaria

independientemente del tipo de suero usado en el medio de MIV (completo vs. delipidado). Uno de los hallazgos más interesante de este estudio fue que los niveles de expresión de los genes asociados al estrés en el retículo endoplásmico –contrariamente a la hipótesis- aumentaron en los ovocitos vitrificados que habían sido madurados en medio con suero delipidado.

Con este estudio podemos afirmar que la maduración de CCOs en un medio suplementado con suero de oveja en estro completo (procedimiento usado habitualmente en esta tecnología) incrementa el contenido de lípidos neutros en el citoplasma de ovocitos, al compararlos con aquellos ovocitos inmaduros que aún no fueron expuestos al medio de MIV. Este incremento no se observó en el grupo de ovocitos madurados en el medio suplementado con suero previamente delipidado. Las gotas lipídicas son sitios intracelulares donde se almacenan lípidos neutros (como triglicéridos o ésteres de colesterol). Hasta hace poco se pensaba que su principal papel era de almacenamiento, pero actualmente se sabe que participan en el metabolismo de los lípidos y en la regulación de la homeostasis energética celular [64]. Durante el proceso de MIV, los lípidos presentes en el suero del medio son incorporados en el citoplasma del ovocito [87], esta presencia de lípidos en el medio de cultivo favorece un incremento en el número de gotas lipídicas de los embriones producidos[88]. Aunque las gotas lipídicas juegan un papel importante en el proceso de maduración del ovocito, debido a que la fosforilación oxidativa es una de las principales rutas para producir ATP [89], la acumulación excesiva de gotas lipídicas se correlaciona con bajas tasas de supervivencia a los procesos de congelación, reduciendo la competencia ovocitaria [90]. En este estudio, se demostró que la maduración *in vitro* de CCOs en medio de maduración suplementado con suero de oveja en estro completo incrementa la acumulación de gotas lipídicas en el citoplasma de ovocitos madurados *in vitro*, un resultado que podría repercutir en la tolerancia de ovocitos a la criopreservación y su competencia ovocitaria.

Como se mencionó anteriormente, existe cierto consenso que la baja criotolerancia de los ovocitos madurados *in vitro* comparado con ovocitos madurados *in vivo* puede estar asociada a un mayor

contenido de lípidos [22], [28], [91]. Basado en esta idea, diferentes estrategias han sido utilizadas para reducir la cantidad de gotas lipídicas de los ovocitos, con la finalidad de incrementar su tolerancia a los procesos de criopreservación [28]. Una de las posibles soluciones es la reducción de nutrientes en el medio de MIV, por ejemplo, usando medios libres de suero, una alternativa que por lo general afecta de forma negativa la competencia ovocitaria [92], [93]. El protocolo descrito en esta tesis permitió la delipidación del suero de oveja en estro, disminuyendo la cantidad de triglicéridos, colesterol y AGNE. Según nuestro conocimiento, ningún estudio había utilizado el método Cleanascite HC para generar un medio de MIV reducido en lípidos. Este método tiene ciertas ventajas sobre los métodos tradicionales de delipidación (los cuales utilizan cloroformo), ya que es muy simple y además no presenta ningún riesgo de toxicidad para el usuario [94]. Otra alternativa para reducir el contenido lipídico en los ovocitos ha sido la adición de sustancias que promueven el metabolismo lipídico (como L-Carnitina) [95]. Aparentemente, esta estrategia incrementa las tasas de sobrevivencia después de la criopreservación, y es menos perjudicial para ovocitos y embriones que la delipidación por métodos mecánicos [28]. El presente estudio mostró que nuestro sistema de MIV con suero delipidado redujo la cantidad de gotas lipídicas sin afectar las tasas de clivaje, desarrollo y eclosión. El procedimiento descrito, permitirá a los técnicos de laboratorio utilizar un protocolo seguro e inocuo para el ovocito y el operario, y realizar la delipidación de muchos ovocitos al mismo tiempo sin la necesidad de micromanipular células individualmente, lo cual consume mucho tiempo y suele ser poco práctico para los sistemas de PIV.

La competencia ovocitaria fue afectada por la criopreservación, independientemente del ambiente lipídico en el cual los CCOs fueron madurados (suero de oveja en estro completo vs. delipidado). Es bien conocido que los ovocitos presentan una gran sensibilidad a los procesos de enfriamiento, propio de sus características intrínsecas, motivo por el cual los protocolos de criopreservación no son tan exitosos y están menos estandarizados que aquellos para semen y embriones [96]. El método de vitrificación surge como una alternativa a la congelación, con la finalidad de superar las dificultades asociadas a la

criopreservación de ovocitos de algunas especies. Por ejemplo, el uso del Cryotop -un método de vitrificación que combina mínimo volumen ($<0,1 \mu\text{l}$) con altas tasas de enfriamiento ($22.800 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$)- ha permitido obtener tasas de sobrevivencia postcalentamiento $>90\%$ con ovocitos humanos y tasas de llegada a blastocisto cercanas al 50% [43]. Sin embargo, a diferencia de los humanos, los ovocitos de animales domésticos presentan una mayor sensibilidad a la criopreservación, asociado en parte a un alto contenido de lípidos [28]. Es por esta razón es que la reducción del contenido de lípido en el citoplasma de ovocitos representa una estrategia atractiva para mejorar las tasas de éxito a la vitrificación. Como era de esperar, los ovocitos vitrificados tuvieron una menor tasa de clivaje y desarrollo embrionario, al compararlos con los grupos sin vitrificar. Interesantemente, aunque el uso de suero delipidado en el medio de MIV permitió que los ovocitos madurados *in vitro* tuvieran un menor contenido de lípidos en su citoplasma, no se observaron mejores tasas de clivaje ni de desarrollo embrionario, al compararlos con los ovocitos madurados en medio suplementado con suero completo. Por lo tanto, los resultados demuestran que la vitrificación mediante un método de volumen mínimo afecta negativamente la competencia ovocitaria, y que dicho efecto no puede ser superado por la reducción del contenido lipídico durante la maduración.

Aunque la idea de que a mayor contenido de lípidos menor tasa de sobrevivencia a la criopreservación parece estar bastante aceptada para ovocitos y embriones [97], algunos trabajos no respaldan completamente esta idea [22], [55], [97]. Más que al contenido lipídico, algunos autores sugieren que la menor sobrevivencia de los embriones PIV se debe a un desbalance en el metabolismo de óxido-reducción. La acumulación excesiva de especies reactivas de oxígeno en el cultivo podría afectar la tolerancia de los embriones a la criopreservación [22]. Los resultados obtenidos en este estudio no muestran un efecto favorable de la disminución en el contenido lipídico, y sugieren ciertas dudas sobre la idea de la relación existente entre el contenido de lípidos y la criotolerancia de los ovocitos. Está claramente establecido que los embriones derivados de animales *in vivo* tienen menos lípidos que

aquellos producidos *in vitro* [Revisado por 98]. Esta diferencia en el contenido de lípidos podría explicar en parte las diferencias observadas en cuanto a la tolerancia de los embriones a la criopreservación [99]. En cuanto a los ovocitos, algunos autores han reportado diferente criotolerancia entre ovocitos de vacas y cerdos madurados *in vitro* vs. *in vivo* [100], [101]. Estas observaciones soportan la idea de que los ovocitos madurados *in vitro* en un medio delipidado podrían asemejarse en términos del contenido de gotas lipídicas a los madurados *in vivo*, y su toleración a la vitrificación debería mejorar. Sin embargo, en el presente estudio los CCOs madurados en un medio de MIV suplementado con suero delipidado exhibieron un menor contenido de gotas lipídicas, pero no mostraron diferencias en la competencia ovocitaria. Antes de cuestionar la existencia de esta asociación en ovocitos ovinos, debemos considerar que también es posible que la disminución obtenida en el contenido lipídico haya sido insuficiente para alterar su tolerancia a la vitrificación.

En este estudio también demostramos que en aquellos ovocitos madurados en un medio reducido en lípidos, se indujo una mayor expresión de los genes asociados al estrés en el RE cuando fueron sometidos al proceso de vitrificación. El RE tiene una variedad de funciones que incluyen translocación de proteínas, plegamiento y modificación de proteínas en el lumen del RE, biosíntesis de lípidos, acumulación de calcio, entre otras. La capacidad de plegamiento del RE puede ser alterada por estímulos patológicos y fisiológicos lo cual puede ocasionar una acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen induciendo estrés [102]. Esta situación de estrés activa una respuesta de homeostasis, denominada respuesta a proteínas desplegadas (UPR) [103]. La activación de UPR activa PERK, IRE1 y ATF6 (receptores de membrana del RE). Las diferencias en los niveles de expresión de los genes UPR han sido relacionados al contenido de gotas lipídicas en ovocitos de ratones. Además la expresión de *GRP78* es mayor en ovocitos de ratón madurados *in vitro* enriquecido en lípidos [67]. A su vez, la peroxidación de lípidos ha sido asociada a la inducción de UPR en células endoteliales [104] y el aumento de *XBP1* ha sido reportado en ovocitos de ratón vitrificados [80]. Los datos reportados en esta tesis revelan que luego

de la maduración, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de *ATF4*, *ATF6*, *GRP78*, y *CHOP* de los ovocitos que fueron madurados *in vitro* en medio completo o delipidado. Se observó una mayor expresión de *GRP78* en ovocitos inmaduros que en aquellos madurados *in vitro*. Esta disminución de los niveles de expresión de *GRP78* de CCOs madurados *in vitro* podría ser consecuencia de la suplementación del medio con FSH, tal como fue reportado previamente en ratones [105]. El proceso de vitrificación de los ovocitos aumentó los niveles de expresión de *ATF4*, *ATF6*, *CHOP* y *GRP78*. Algunos autores han sugerido que las gotas lipídicas pueden servir de sitio de almacenamiento para proteínas que se encuentran en exceso o mal plegadas, y por lo tanto disminuirían el estrés en el RE [106]. Considerando esta información en conjunto, nuestros resultados sugieren que la cantidad de gotas lipídicas en los CCOs madurados en suero completo reducirían su sensibilidad al estrés asociado al RE inducido por la vitrificación. Otra posibilidad que podría explicar los resultados aquí reportados, es que el aumento de los niveles de expresión de estos genes esté asociada a la competencia ovocitaria mediante otro mecanismo. Diferentes genes asociados a la respuesta adaptativa UPR han sido identificados en ovocitos y su inducción se ha reportado en embriones de cerdo y ratón en estadios tempranos previo a la implantación [107], [108], lo que podría suponer que la expresión de estos genes sería una condición normal de estos estadios. Sin embargo existen algunos trabajos que se oponen a esta idea. Algunos estudios han reportado que la inhibición UPR usando diferentes agentes (TUDCA o Salubrinal), parece promover la maduración de ovocitos de cerdo y de ratón *in vitro*. La adición de estos agentes inhibitorios en el medio de cultivo, previenen la inducción de estrés en RE y la apoptosis mediada por UPR [108], [109]. Por lo tanto el estrés en el RE sería un fenómeno clave que afecta la sobrevivencia y la competencia ovocitaria. En suma, esta tesis muestra por primera vez la expresión de *ATF4*, *ATF6*, *CHOP* y *GRP78* en ovocitos de ovejas. Además, se demostró que la vitrificación puede causar activación de UPR cuando los ovocitos poseen un contenido reducido de gotas lipídicas. Son necesarios futuros estudios que permitan evaluar la expresión de estos genes en diferentes estadios embrionarios preimplantatorios para

determinar la variabilidad en su expresión y poder establecer si la respuesta al estrés en el RE es sostenida en el tiempo y dirigida hacia la rama adaptativa o apoptótica.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Este estudio permitió demostrar que la delipidación del suero de oveja en estro (habitualmente usado para la suplementación del medio de MIV), reduce el contenido de gotas lipídicas en los ovocitos. Se describe por primera vez en ovocitos de rumiantes madurados *in vitro* un método sencillo de reducción del contenido de lípidos. La ventaja del protocolo descrito en esta tesis es que el desarrollo embrionario no fue afectado por el uso de un medio suplementado con suero delipidado, obteniéndose resultados similares a los del grupo control (suero completo). Sin embargo, este menor contenido de gotas lipídicas en ovocitos no mejoró su criotolerancia a la vitrificación. Cuando estos ovocitos fueron sometidos al proceso de vitrificación/calentamiento, la expresión de los genes UPR fue mayor en aquellos ovocitos con menor contenido de gotas lipídicas. Considerando estos resultados, sugerimos que la idea de que la criotolerancia de los ovocitos puede ser mejorada por la reducción de su contenido de lípidos, al menos en ovinos debería ser revisada. También sugerimos que las gotas lipídicas cumplen una función en la competencia ovocitaria, probablemente como reservorio energético para el desarrollo embrionario *in vitro* con cierta participación en respuestas adaptativas a situaciones de estrés, como es el caso de UPR. Futuros estudios son importantes para determinar si la activación de UPR puede repercutir en la calidad embrionaria, tasas de preñez y de nacimiento cuando los embriones son originados en sistemas de producción *in vitro*, de igual forma sería interesante determinar si la activación de UPR ocurre en modelos *in vivo* bajo diferentes condiciones metabólicas.

REFERENCIAS

- [1] I. Gordon, *Laboratory production of cattle embryos 2nd edition*. 2003.
- [2] B. G. Brackett, D. Bousquet, M. L. Boice, W. J. Donawick, J. F. Evans, and M. a Dressel, "Normal development following in vitro fertilization in the cow," *Biol. Reprod.*, vol. 27, no. 1, pp. 147–158, 1982.
- [3] W. T. K. Cheng, R. M. Moor, and C. Polge, "In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro," *Theriogenology*, vol. 25, no. 1, p. 146, Jan. 1986.
- [4] M. Vilariño, M. Crispo, P. . dos Santos Neto, R. Wijma, and A. Menchaca, "The effect of culture medium changes on in vitro production of sheep embryos," *Reprod. Domest. Anim*, vol. 47, no. 1806, 2012.
- [5] A. Menchaca, N. Barrera, P. C. dos Santos, F. Cuadro, and M. Crispo, "Advances and limitations of in vitro embryo production in sheep and goats," *Anim. Reprod.*, vol. 13, no. 3, pp. 273–278, 2016.
- [6] R. B. Gilchrist and J. G. Thompson, "Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro," *Theriogenology*, vol. 67, no. 1, pp. 6–15, 2007.
- [7] P. Lonergan and T. Fair, "Maturation of Oocytes in Vitro.," *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, vol. 4, pp. 255–268, 2016.
- [8] D. F. Albertini, C. M. H. Combelles, E. Benecchi, and M. J. Carabatsos, "Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development," *Reproduction*, vol. 121, no. 5, pp. 647–653, 2001.
- [9] N. a. Wani, "In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes," *Small Ruminant Research*, vol. 44, no. 2, pp. 89–95, 2002.
- [10] D. Rizados, F. Ward, P. Duffy, M. P. Boland, and P. Lonergan, "Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality," *Mol. Reprod. Dev.*, vol. 61, no. 2, pp. 234–248, 2002.
- [11] C. Galli and R. M. Moor, "Gonadotrophin requirements for the in vitro maturation of sheep oocytes and their subsequent embryonic development," *Theriogenology*, vol. 35, no. 6, pp. 1083–1093, 1991.
- [12] W. F. Marei, F. Ghafari, and A. A. Fouladi-Nashta, "Role of hyaluronic acid in maturation and further early embryo development of bovine oocytes," *Theriogenology*, vol. 78, no. 3, pp. 670–677, 2012.
- [13] P. Blondin, D. Bousquet, H. Twagiramungu, F. Barnes, and M.-A. Sirard, "Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes.," *Biol. Reprod.*, vol. 66, no. 1, pp. 38–43, 2002.
- [14] F. Izadyar, B. Colenbrander, and M. M. Bevers, "In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development," *Mol. Reprod. Dev.*, vol. 45, no. 3, pp. 372–377, 1996.

- [15] H. K. Shabankareh and M. Zandi, "Developmental potential of sheep oocytes cultured in different maturation media: effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, and cysteamine," *Fertil. Steril.*, vol. 94, no. 1, pp. 335–340, 2010.
- [16] M. C. Crocco, D. M. Kelmansky, and M. I. Mariano, "Does serum cause lipid-droplet accumulation in bovine embryos produced in vitro, during developmental days 1 to 4?," *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 30, no. 10, pp. 1377–1388, 2013.
- [17] A. Reis *et al.*, "Consequences of exposure to serum, with or without vitamin E supplementation, in terms of the fatty acid content and viability of bovine blastocysts produced in vitro," *Reprod. Fertil. Dev.*, vol. 15, no. 5–6, pp. 275–284, 2003.
- [18] K. Moore *et al.*, "In vitro production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: Effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term," *Theriogenology*, vol. 68, no. 9, pp. 1316–1325, 2007.
- [19] G. Bin Zhou and N. Li, "Cryopreservation of porcine oocytes: Recent advances," *Molecular Human Reproduction*, vol. 15, no. 5, pp. 279–285, 2009.
- [20] W. F. A. Marei, M. A. Alvarez, V. Van Hoeck, A. Gutierrez-Adan, P. E. J. Bols, and J. L. M. R. Leroy, "Effect of nutritionally induced hyperlipidaemia on in vitro bovine embryo quality depends on the type of major fatty acid in the diet," *Reprod. Fertil. Dev.*, vol. 29, no. 9, pp. 1856–1867, 2017.
- [21] J. F. W. Sprícigo *et al.*, "Effects of Different Maturation Systems on Bovine Oocyte Quality, Plasma Membrane Phospholipid Composition and Resistance to Vitrification and Warming.," *PLoS One*, vol. 10, no. 6, pp. 123–144, 2015.
- [22] M. J. Sudano *et al.*, "Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification," *Theriogenology*, vol. 75, no. 7, pp. 1211–1220, 2011.
- [23] C. Diez, Y. Heyman, D. Le Bourhis, C. Guyader-Joly, J. Degrouard, and J. P. Renard, "Delipidating in vitro-produced bovine zygotes: Effect on further development and consequences for freezability," *Theriogenology*, vol. 55, no. 4, pp. 923–936, 2001.
- [24] C. Carolan, P. Lonergan, H. Khatir, and P. Mermillod, "In vitro production of bovine embryos using individual oocytes," *Mol. Reprod. Dev.*, vol. 45, no. 2, pp. 145–150, 1996.
- [25] a Van Langendonck *et al.*, "Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium.," *J. Reprod. Fertil.*, vol. 109, no. 1, pp. 87–93, 1997.
- [26] J. R. Hill, "Incidence of Abnormal Offspring from Cloning and Other Assisted Reproductive Technologies," *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, vol. 2, no. 1, pp. 307–321, 2014.
- [27] D. Rizos, A. Gutiérrez-Adán, S. Pérez-Garnelo, J. de la Fuente, M. P. Boland, and P. Lonergan, "Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression1," *Biol. Reprod.*, vol. 68, no. 1, pp. 236–243, 2003.
- [28] G. Wirtu, J. McGill, L. Crawford, G. Reddy, W. G. Bergen, and L. Simon, "Targeting Lipid Metabolism to Improve Oocyte Cryopreservation (OCP) in Domestic Animals," vol. 1, no. 1, pp. 15–20, 2013.

- [29] G. Vajta and M. Kuwayama, "Improving cryopreservation systems," *Theriogenology*, vol. 65, no. 1, pp. 236–244, 2006.
- [30] G. Vajta, "Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals," *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 60–61, pp. 357–364, 2000.
- [31] D. Whittingham, "Survival of mouse embryos after freezing and thawing," *Nature*, vol. 233, no. 5315, pp. 125–6, 1971.
- [32] C. Chen, "PREGNANCY AFTER HUMAN OOCYTE CRYOPRESERVATION," *Lancet*, vol. 327, no. 8486, pp. 884–886, 1986.
- [33] S. Ai-hasani, J. Kirsch, K. Diedrich, S. Blanke, H. Van Der Ven, and D. Krebs, "Successful embryo transfer of cryopreserved and in-vitro fertilized rabbit oocytes," *Hum. Reprod.*, vol. 4, no. 1, pp. 77–79, 1989.
- [34] E. Fuku, T. Kojima, Y. Shioya, G. J. Marcus, and B. R. Downey, "In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes," *Cryobiology*, vol. 29, no. 4, pp. 485–492, 1992.
- [35] S. Hochi, "Cryopreservation of follicular oocytes and preimplantation embryos in cattle and horses," *J. Reprod. Dev.*, vol. 49, no. 1, pp. 13–21, 2003.
- [36] I. Dike, "Efficiency of intracellular cryoprotectants on the cryopreservation of sheep oocytes by controlled slow freezing and vitrification techniques," *J. Cell Anim. Biol.*, vol. 3, no. 3, pp. 44–49, 2009.
- [37] D. A. Gook, "History of oocyte cryopreservation," *Reprod. Biomed. Online*, vol. 23, no. 3, pp. 281–289, 2011.
- [38] I. S. Hwang and S. Hochi, "Recent progress in cryopreservation of bovine oocytes," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, 2014.
- [39] N. De Munck and G. Vajta, "Safety and efficiency of oocyte vitrification," *Cryobiology*, vol. 78, pp. 119–127, Oct. 2017.
- [40] M. E. Hammadeh, A. S. Askari, T. Georg, P. Rosenbaum, and W. Schmidt, "Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men," *Int. J. Androl.*, vol. 22, no. 3, pp. 155–162, 1999.
- [41] J. R. Prentice and M. Anzar, "Cryopreservation of Mammalian Oocyte for Conservation of Animal Genetics," *Vet. Med. Int.*, vol. 2011, pp. 1–11, 2011.
- [42] Y. Agca, "Cryopreservation of oocyte and ovarian tissue," *Ilar J*, vol. 41, no. 4, pp. 207–220, 2000.
- [43] M. Kuwayama, O. Kato, S. P. Leibo, and P. Genetics, "Article Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes," *Biomedicine*, vol. 11, no. 3, pp. 300–308, 2005.
- [44] K. Jewgenow, C. Wiedemann, M. F. Bertelsen, and J. Ringleb, "Cryopreservation of mammalian ovaries and oocytes," *Int. Zoo Yearb.*, vol. 45, no. 1, pp. 124–132, 2011.
- [45] B. J. Luyet, "Vitrification of water [5]," *Physical Review*, vol. 56, no. 12, p. 1244, 1939.
- [46] W. F. Rall and G. M. Fahy, "Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification," *Nature*, vol. 313, no. 6003, pp. 573–575, 1985.

- [47] S. Tavukcuoglu, T. Al-Azawi, A. A. Khaki, and S. Al-Hasani, "Is vitrification standard method of cryopreservation," *Middle East Fertility Society Journal*, vol. 17, no. 3, pp. 152–156, 2012.
- [48] S. Yavin and A. Arav, "Measurement of essential physical properties of vitrification solutions," *Theriogenology*, vol. 67, no. 1, pp. 81–89, 2007.
- [49] A. Arav and Y. Zeron, "Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is effected by the composition and the concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions," *Theriogenology*, vol. 47, no. 1, p. 341, Jan. 2018.
- [50] A. Arav, "Vitrification at minimum volume: From basic science to clinical application," in *Vitrification in Assisted Reproduction*, Second., M. Tucker and J. Liebermann, Eds. Boca Raton, FL: CRC Press, 2016, pp. 69–75.
- [51] S. Saha, T. Otoi, M. Takagi, A. Boediono, C. Sumantri, and T. Suzuki, "Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone," *Cryobiology*, vol. 33, no. 3, pp. 291–299, 1996.
- [52] A. Arav, S. Yavin, Y. Zeron, D. Natan, I. Dekel, and H. Gacitua, "New trends in gamete's cryopreservation," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 187, no. 1–2, pp. 77–81, 2002.
- [53] G. Gandhi, M. Kuwayama, S. Kagalwala, and P. Pangerkar, "Appendix A: Cryotech® vitrification thawing," in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1568, 2017, pp. 281–295.
- [54] A. E. Hurtt, F. Landim-Alvarenga, G. E. Scidel, and E. L. Squires, "Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws," *Theriogenology*, vol. 54, no. 1, pp. 119–128, 2000.
- [55] Y. Du *et al.*, "High hydrostatic pressure: A new way to improve in vitro developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification," *Reproduction*, vol. 135, no. 1, pp. 13–17, 2008.
- [56] H. A. Hochi S, Ito K, Hirabayashi M, Ueda M, Kimura K, "Effect of nuclear stages during IVM on the survival of vitrified-warmed bovine oocytes.," *Theriogenology*, vol. 49, no. 4, pp. 787–796, 1998.
- [57] V. Isachenko, J. L. Alabart, F. Nawroth, E. Isachenko, G. Vajta, and J. Folch, "The open pulled straw vitrification of ovine GV-oocytes: Positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both?," *Cryo-Letters*, vol. 22, no. 3, pp. 157–162, 2001.
- [58] A. R. Moawad, J. Zhu, I. Choi, D. Amarnath, W. Chen, and K. H. S. Campbell, "Production of good-quality blastocyst embryos following IVF of ovine oocytes vitrified at the germinal vesicle stage using a cryoloop," *Reprod. Fertil. Dev.*, vol. 25, no. 8, pp. 1204–1215, 2013.
- [59] L. J. Maclellan, E. M. Carnevale, M. A. Coutinho da Silva, C. F. Scoggin, J. E. Bruemmer, and E. L. Squires, "Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares," *Theriogenology*, vol. 58, no. 5, pp. 911–919, 2002.
- [60] P. M. M. De Leon *et al.*, "Cryopreservation of immature equine oocytes, comparing a solid surface vitrification process with open pulled straws and the use of a synthetic ice blocker," *Theriogenology*, vol. 77, no. 1, pp. 21–27, 2012.
- [61] S. Succu *et al.*, "Vitrification devices affect structural and molecular status of in vitro matured ovine oocytes," *Mol. Reprod. Dev.*, vol. 74, no. 10, pp. 1337–1344, 2007.

- [62] J. Zhang, T. L. Nedambale, M. Yang, and J. Li, "Improved development of ovine matured oocyte following solid surface vitrification (SSV): Effect of cumulus cells and cytoskeleton stabilizer," *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 110, no. 1–2, pp. 46–55, 2009.
- [63] S. Succu *et al.*, "Vitrification of in vitro matured ovine oocytes affects in vitro pre-implantation development and mRNA abundance," *Mol. Reprod. Dev.*, vol. 75, no. 3, pp. 538–546, 2008.
- [64] M. A. Welte, "Expanding roles for lipid droplets," *Curr. Biol.*, vol. 25, no. 11, pp. R470–R481, 2015.
- [65] T. Takahashi *et al.*, "Supplementation of culture medium with class L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro," *Reprod. Fertil. Dev.*, vol. 25, no. 4, pp. 589–599, 2013.
- [66] T. G. McEvoy, G. D. Coull, P. J. Broadbent, J. S. M. Hutchinson, and B. K. Speake, "Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida," *J Reprod Fertil*, vol. 118, no. 1, pp. 163–170, 2000.
- [67] X. Yang *et al.*, "Exposure to lipid-rich follicular fluid is associated with endoplasmic reticulum stress and impaired oocyte maturation in cumulus-oocyte complexes," *Fertil. Steril.*, vol. 97, no. 6, pp. 1438–1443, 2012.
- [68] H. Aardema *et al.*, "Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence.," *Biol. Reprod.*, vol. 85, no. 1, pp. 62–9, 2011.
- [69] K. R. Dunning, D. L. Russell, and R. L. Robker, "Lipids and oocyte developmental competence: The role of fatty acids and ??-oxidation," *Reproduction*, vol. 148, no. 1, 2014.
- [70] H. Nagashima, N. Kashiwazaki, R. J. Ashman, C. G. Grupen, R. F. Seamark, and M. B. Nottle, "Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling.," *Biol. Reprod.*, vol. 51, no. 4, pp. 618–622, 1994.
- [71] L. Ren, B. Fu, H. Ma, and D. Liu, "Effects of mechanical delipation in porcine oocytes on mitochondrial distribution, ROS activity and viability after vitrification," *Cryo Letters*, vol. 36, no. 1, pp. 30–36, 2015.
- [72] T. Phongnimitr *et al.*, "Effect of L-carnitine on maturation, cryo-tolerance and embryo developmental competence of bovine oocytes," *Anim. Sci. J.*, vol. 84, no. 11, pp. 719–725, 2013.
- [73] G. Q. Wu *et al.*, "L-carnitine enhances oocyte maturation and development of parthenogenetic embryos in pigs," *Theriogenology*, vol. 76, no. 5, pp. 785–793, 2011.
- [74] J. Leroy, G. Genicot, I. Donnay, and A. Van Soom, "Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with Nile red: a practical approach," *Reprod.Domest.Anim*, vol. 40, no. 1, pp. 76–78, 2005.
- [75] H. Abe, S. Yamashita, T. Satoh, and H. Hoshi, "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.*, vol. 61, no. 1, pp. 57–66, 2002.
- [76] R. J. Kaufman, "Regulation of mRNA translation by protein folding in the endoplasmic reticulum," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 29, no. 3, pp. 152–158, 2004.
- [77] W. E. Balch, R. I. Morimoto, A. Dillin, and J. W. Kelly, "Adapting proteostasis for disease intervention.," *Science*, vol. 319, no. 5865, pp. 916–9, 2008.

- [78] S. S. Vembar and J. L. Brodsky, "One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. 12, pp. 944–57, 2008.
- [79] C. Xu, B. Bailly-Maitre, and J. C. Reed, "Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions.," *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 10, pp. 2656–64, 2005.
- [80] N. Zhao *et al.*, "Endoplasmic reticulum stress inhibition is a valid therapeutic strategy in vitrifying oocytes," *Cryobiology*, vol. 70, no. 1, pp. 48–52, 2015.
- [81] A. Menchaca and E. Rubianes, "New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants," *Reprod. Fertil. Dev.*, vol. 16, no. 4, pp. 403–413, 2004.
- [82] P. C. dos Santos Neto, M. Vilariño, N. Barrera, F. Cuadro, M. Crispo, and A. Menchaca, "Cryotolerance of Day 2 or Day 6 in vitro produced ovine embryos after vitrification by Cryotop or Spatula methods," *Cryobiology*, 2015.
- [83] P. C. dos Santos-Neto, F. Cuadro, N. Barrera, M. Crispo, and A. Menchaca, "Embryo survival and birth rate after minimum volume vitrification or slow freezing of in vivo and in vitro produced ovine embryos," *Cryobiology*, vol. 78, pp. 8–14, 2017.
- [84] A. N. Tamura, T. T. F. Huang, and Y. Marikawa, "Impact of vitrification on the meiotic spindle and components of the microtubule-organizing center in mouse mature oocytes.," *Biol. Reprod.*, vol. 89, no. 5, p. 112, 2013.
- [85] T. O'Connor, I. Wilmut, and J. Taylor, "Quantitative evaluation of reference genes for real-time PCR during in vitro maturation of ovine oocytes," *Reprod. Domest. Anim.*, vol. 48, no. 3, pp. 477–483, 2013.
- [86] M. W. Pfaffl, "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, no. 9, p. e45, 2001.
- [87] J. Y. Kim, M. Kinoshita, M. Ohnishi, and Y. Fukui, "Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes," *Reproduction*, vol. 122, no. 1, pp. 131–138, 2001.
- [88] J. Leroy, G. Genicot, I. Donnay, and A. Van Soom, "Short Communication Evaluation of the Lipid Content in Bovine Oocytes and Embryos with Nile Red : a Practical Approach," vol. 78, pp. 76–78, 2005.
- [89] R. G. Sturmey and H. J. Leese, "Energy metabolism in pig oocytes and early embryos," *Reproduction*, vol. 126, no. 2, pp. 197–204, 2003.
- [90] E. G. Prates, J. T. Nunes, and R. M. Pereira, "A role of lipid metabolism during cumulus-oocyte complex maturation: Impact of lipid modulators to improve embryo production," *Mediators Inflamm.*, vol. 2014, 2014.
- [91] A. Shirazi, M. A. Ardali, E. Ahmadi, H. Nazari, M. Mamuee, and B. Heidari, "The effect of macromolecule source and type of media during in vitro maturation of sheep oocytes on subsequent embryo development," *J. Reprod. Infertil.*, vol. 13, no. 1, pp. 13–19, 2012.
- [92] M. F. Accorsi, B. C. da S. Leão, N. A. de S. Rocha-Frigoni, S. H. V. Perri, and G. Z. Mingoti, "Reduction in cytoplasmic lipid content in bovine embryos cultured in vitro with linoleic acid in semi-defined medium is correlated with increases in cryotolerance," *Zygote*, vol. 24, no. 4, pp. 485–494, 2015.

- [93] A. Mishra, P. S. P. Gupta, V. Sejian, I. J. Reddy, and J. P. Ravindra, "Maturation timing and fetal bovine serum concentration for developmental potential of sheep oocytes in vitro," vol. 54, no. October, pp. 630–633, 2016.
- [94] A. R. Castro, W. E. Morrill, and V. Pope, "Lipid removal from human serum samples," *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, vol. 7, no. 2, pp. 197–199, 2000.
- [95] K. R. Dunning and R. L. Robker, "Promoting lipid utilization with l-carnitine to improve oocyte quality," *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 134, no. 1–2, pp. 69–75, 2012.
- [96] E. J. Woods, J. D. Benson, Y. Agca, and J. K. Critser, "Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues," *Cryobiology*, vol. 48, no. 2, pp. 146–156, 2004.
- [97] M. Carro, J. Buschiazzi, G. L. Ríos, G. M. Oresti, and R. H. Alberio, "Linoleic acid stimulates neutral lipid accumulation in lipid droplets of maturing bovine oocytes," *Theriogenology*, vol. 79, no. 4, pp. 687–694, 2013.
- [98] G. E. Seidel, "Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation," *Theriogenology*, vol. 65, no. 1, pp. 228–235, 2006.
- [99] D. Rizos, T. Fair, S. Papadopoulos, M. Boland, and P. Lonergan, "Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro," *Mol. Reprod. Dev.*, vol. 62, no. 3, pp. 320–327, 2002.
- [100] E. Collado-Fernandez, H. M. Picton, and Ré. Dumollard, "Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals," *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 56, no. 10–12, pp. 799–808, 2012.
- [101] K. Kikuchi *et al.*, "Morphological features of lipid droplet transition during porcine oocyte fertilisation and early embryonic development to blastocyst in vivo and in vitro," *Zygote*, vol. 10, no. 4, pp. 355–366, 2002.
- [102] C. M. Osowski and F. Urano, "Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system," *Methods Enzymol.*, vol. 490, no. 508, pp. 71–92, 2013.
- [103] R. Volmer and D. Ron, "Lipid-dependent regulation of the unfolded protein response," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 33, pp. 67–73, 2015.
- [104] E. Vladykovskaya *et al.*, "Lipid peroxidation product 4-hydroxy-trans-2-nonenal causes endothelial activation by inducing endoplasmic reticulum stress," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 14, pp. 11398–11409, 2012.
- [105] E. Babayev, D. Lalioti, M. F. Favero, and E. Seli, "Cross-talk between FSH and endoplasmic reticulum stress: A mutually suppressive relationship," *Reprod. Sci.*, vol. 23, no. 3, pp. 352–364, 2016.
- [106] X. Zhang and K. Zhang, "Endoplasmic reticulum stress-associated lipid droplet formation and type II diabetes," *Biochem. Res. Int.*, vol. 2012, 2012.
- [107] M. Michalak and M. C. Gye, "Endoplasmic reticulum stress in periimplantation embryos," *Clin. Exp. Reprod. Med.*, vol. 42, no. 1, pp. 1–7, 2015.
- [108] J. Y. Zhang, Y. F. Diao, R. K. Oqani, R. X. Han, and D. I. Jin, "Effect of Endoplasmic Reticulum Stress on Porcine Oocyte Maturation and Parthenogenetic Embryonic Development In Vitro," *Biol. Reprod.*, vol. 86, no. 4, pp. 128–128, 2012.

- [109] L. L. Wu, D. L. Russell, R. J. Norman, and R. L. Robker, "Endoplasmic reticulum (ER) stress in cumulus-oocyte complexes impairs pentraxin-3 secretion, mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$), and embryo development.," *Mol. Endocrinol.*, vol. 26, no. 4, pp. 562–73, 2012.

PUBLICACIÓN

RESEARCH ARTICLE

Impact of delipidated estrous sheep serum supplementation on *in vitro* maturation, cryotolerance and endoplasmic reticulum stress gene expression of sheep oocytes

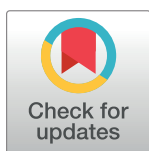
Natalibeth Barrera^{1☯*}, Pedro C. dos Santos Neto^{1‡}, Federico Cuadro^{1‡}, Diego Bosolasco^{1‡}, Ana P. Mulet^{2‡}, Martina Crispo^{2‡}, Alejo Menchaca^{1☯*}

1 Instituto de Reproducción Animal Uruguay, Fundación IRAUy, Montevideo, Uruguay, **2** Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

☯ These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work.

* natalibethbarrera@gmail.com (NB); menchaca.alejo@gmail.com (AM)



OPEN ACCESS

Citation: Barrera N, dos Santos Neto PC, Cuadro F, Bosolasco D, Mulet AP, Crispo M, et al. (2018) Impact of delipidated estrous sheep serum supplementation on *in vitro* maturation, cryotolerance and endoplasmic reticulum stress gene expression of sheep oocytes. PLoS ONE 13 (6): e0198742. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198742>

Editor: Yang Yu, Peking University Third Hospital, CHINA

Received: January 9, 2018

Accepted: May 24, 2018

Published: June 18, 2018

Copyright: © 2018 Barrera et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by Agencia Nacional de Innovación e Investigación POSNAC201311217 NB Union Agriculture Group (UAG) to AM. AM and MC are fellows of Sistema Nacional de Investigadores (SNI) and PEDECIBA. The funders had no role in study design, data

Abstract

High lipid content of oocytes and embryos in domestic animals is one of the well-known factors associated with poor cryosurvival. Herein, we wanted to determine whether the use of delipidated estrous sheep serum during *in vitro* maturation (IVM) of ovine oocytes reduces the cytoplasmic lipid droplets content and improves embryo development and cryotolerance after vitrification. Cumulus oocytes complexes (COCs) were matured *in vitro* for 24 h in medium supplemented with whole or delipidated estrous sheep serum prior to vitrification. Neutral lipid present in lipid droplets of COCs, cleavage rate, embryo development rate on Day 6 and Day 8, and hatching rate on Day 8, were compared among experimental groups. Endoplasmic reticulum stress genes were evaluated in *in vitro* matured COCs under different lipid conditions prior to vitrification. The lipid droplets' content (mean fluorescence intensity) of oocytes cultured with IVM media supplemented with delipidated serum was lower than COCs matured with whole serum (7.6 ± 1.7 vs. 22.8 ± 5.0 arbitrary units, respectively; $P < 0.05$). Despite IVM treatment, oocytes subjected to vitrification showed impaired competence compared with the non-vitrified groups ($P < 0.05$). No significant differences in embryo production were observed in non-vitrified COCs after maturation in delipidated or whole serum (33.4 ± 4.9 vs 31.9 ± 4.2). COCs matured in delipidated serum and subjected to vitrification showed increased expression of *ATF4*, *ATF6*, *GRP78*, and *CHOP10* genes (ER stress markers). Collectively, our results demonstrate that although supplementation of IVM medium with delipidated estrous sheep serum reduces the presence of cytoplasmic lipid droplets in oocytes after maturation, oocyte cryotolerance is not improved. Notably, the expression of genes associated with the unfolded protein response (UPR) was increased in COCs, with fewer lipid droplets subjected to vitrification, suggesting that oocyte cryopreservation is associated with ER stress and activation of adaptive responses.

collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Within the last decade, there have been significant advances in methods to improve oocyte cryotolerance. Difficulties associated to oocyte cryopreservation are related with inherent structural and physiological features. Particularly in domestic animals, the high intracellular lipid content of oocytes adds greater complexity to cryopreservation. Different strategies have been developed to reduce lipid droplets in oocytes including mechanical removal and pharmacological options [1–3]. Furthermore, it is generally accepted that *in vitro* embryo production (IVEP) systems are not as efficient as *in vivo* embryo production, mainly due to lower oocyte competence acquisition when maturation is induced under *in vitro* conditions [1,4,5]. Although the underlying mechanisms behind oocyte competence have not yet been fully elucidated, there is increasing evidence that oocyte metabolism and the somatic environment play crucial roles in determining oocyte growth and developmental competence [6]. Lipid metabolism provides a good source of energy during oocyte maturation upon demand. For example, fatty acids stored within lipid droplets provide adenosine triphosphate (ATP) molecules through β -oxidation, largely serving as an energy source during oocyte maturation and early embryo development [7]. Therefore, components within the culture medium supplied to the cumulus-oocytes complexes (COCs) during *in vitro* maturation have the potential of affecting oocyte competence [8].

Studies show that when oocytes are matured *in vitro*, energy substrates as fatty acids provided through culture media can lead to increased intracellular lipid droplet (LD) accumulation [9–11] and alter oocyte metabolism, thereby affecting their quality. A recent report showed that exposure of mice COCs to high lipid content follicular fluid was associated with endoplasmic reticulum (ER) stress induction and led to a decrease in oocyte competence [12]. Moreover, increased accumulation of lipids in oocytes was correlated with reduced cryopreservation resistance [13]. It is well established that in sheep and other species, *in vitro* generated embryos exhibit reduced cryotolerance [14,15]. The process of cryopreservation leads to multiple changes, including structural modifications and alterations in gene expression patterns [16]. For example, increased expression of genes associated with ER stress has been reported after oocyte cryopreservation. In domestic animals, the high lipid content in oocytes may pose challenges for cryopreservation [10]. Specifically, bovine, ovine, and porcine oocytes are highly susceptible to cryoinjuries, with the majority of studies reporting a blastocyst rate of 0 to 20% [2,17–20] after oocyte vitrification. Additional studies have suggested that tolerance of oocytes to chilling injuries can be increased when cytoplasmic lipid content is reduced, thereby improving cleavage and blastocyst rates [10,21]. Interestingly, the introduction of controlled stress during *in vitro* culture led to improved cleavage and blastocyst rates and suggests that oocytes perform better under specific types of stress signals [22,23]. Induction of pathways related to ER stress have been reported in oocytes subjected to vitrification [12]. ER stress is a mechanism associated with excess intracellular lipid accumulation in COCs [24].

The addition of animal serum to IVEP medium is a standard practice and helps promote oocyte maturation and subsequent embryo development [25]. During culture of ovine oocytes, estrous serum is routinely used to supplement the maturation medium, since it is known that it contains a range of beneficial components, including hormones, growth factors, amino acids, binding proteins. Conversely, estrous serum also provides a significant source of lipids. Therefore, the reduction of lipid content is necessary to improve *in vitro* embryo cryosurvival and blastocyst rates in IVP systems. One strategy to reduce lipid exposure involves incorporation of serum-free media during IVM. [26]. Nutrient restriction in the maturation medium promotes the use of the oocyte's own endogenous reserves, thereby reducing the amount of intracellular lipids [10]. However, oocyte competence is impaired under serum-free culture

conditions compared to undefined media in which serum has been added [21]. Alternatively, restriction of lipid content in the serum may be a more optimal strategy to reduce lipid droplets in the oocyte and may improve oocyte cryosurvival.

The objective of this study was to determine whether supplementation of IVM medium with delipidated estrous sheep serum affects the amount of cytoplasmic LD in *in vitro* matured sheep oocytes. Furthermore, we investigate whether intracellular lipid content variations in oocytes is associated with oocyte developmental competencies, cryotolerance, embryo production, and ER stress.

Materials and methods

Experimental design

Three experiments were conducted by using a total of 2,986 COCs at Fundación IRAUy and Transgenic and Experimental Animal Unit of Institut Pasteur of Montevideo, Uruguay. The experimental design is shown in Fig 1. Unless stated otherwise, all media and chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Experiment 1. Experiment 1 was conducted to evaluate the effect of the lipid content (based on the concentrations of Triglycerides, total Cholesterol, and non-esterified fatty acid (NEFAs)) of IVM medium supplemented with estrous sheep serum on: (a) neutral lipid stored in LD of *in vitro* matured oocytes, and (b) oocyte developmental competence. A total of 866 COCs were collected from slaughterhouse ovaries and subjected to IVM in a supplemented medium with whole estrous sheep serum (Control whole serum group, $n = 452$) or delipidated estrous sheep serum (Delipidated serum group, $n = 414$). Neutral lipid present in LD of partially denuded COCs, cleavage rate, development rate on Day 6 and Day 8, and hatching rate on Day 8, were compared between the two experimental groups (Fig 1). Seven replicates of this experiment were performed for each treatment group.

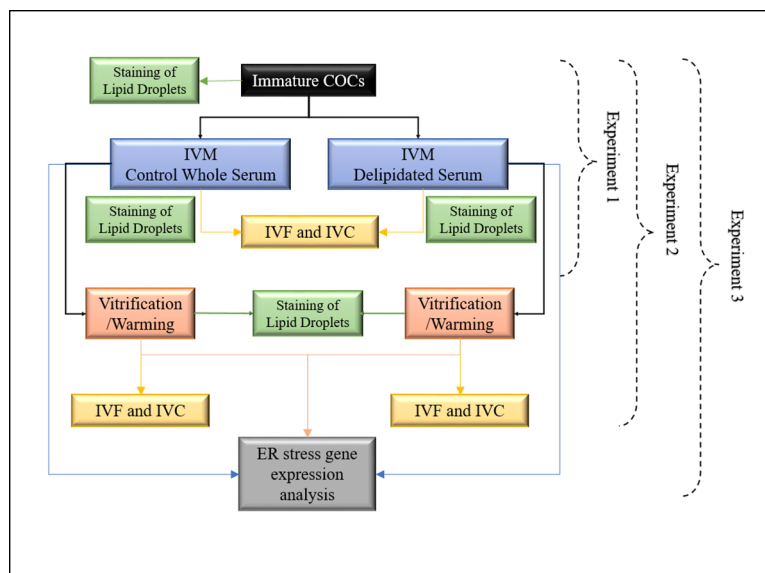


Fig 1. Experimental design. Schematic representation for determination of the effect of control whole estrous sheep serum vs. delipidated serum used during *in vitro* maturation of cumulus oocytes complexes (COCs) on oocyte lipid content and: embryo development (Experiment 1), cryotolerance after vitrification (Experiment 2), and expression of endoplasmic reticulum (ER) stress genes (Experiment 3).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198742.g001>

Experiment 2. Experiment 2 was conducted in order to further investigate the effect of vitrification on the survival rates of oocytes previously matured under different lipid content conditions. Viable immature COCs (1280) were randomly assigned to two experimental groups consisting of IVM medium supplemented with control or delipidated estrous serum sheep.

After IVM, COCs were submitted to IVF and IVC (Control whole serum group, $n = 344$; Delipidated serum group, $n = 357$); or were vitrified using the Cryotop method (Control whole serum + vitrification group, $n = 288$; Delipidated serum + vitrification group, $n = 291$) before IVF and IVC. Oocyte lipid content was assessed by LD staining before and after vitrification/warming, and cleavage rate, development rate on Day 6 and Day 8, and hatching rate on Day 8 were compared among groups (Fig 1). A total of thirteen replicates of this experiment were performed for each treatment group.

Experiment 3. Experiment 3 was performed in order to determine whether *in vitro* matured COCs under different lipid conditions followed by vitrification expresses different levels of ER stress markers. A total of 840 COCs were used to determine ER stress gene expression (*ATF4*, *ATF6*, *GRP78*, and *CHOP10*) by real time PCR in five experimental groups (Immature, Control whole serum group, Delipidated serum group, Control whole serum + Vitrification group, and Delipidated serum + Vitrification group). Seven replicates of this experiment were performed using 30 COCs per replicate for each treatment group.

Estrous sheep serum source, lipid removal and lipid determinations

For serum preparation, blood samples were collected from 15 ewes in estrus previously treated with a hormonal protocol for estrous synchronization [27]. The procedure was approved by the Internal Animal Care Committee of Fundación IRAUy that is certified by the National Council of Animal Care of Uruguay. The blood was allowed to clot at room temperature during one hour and then centrifuged at 1500 g for 20 min at 4°C. Serum was collected, pooled and heat inactivated at 56°C for 30 min. Lipid removal from serum was performed by using Cleanascite™ (Biotech Support Group, NJ, USA) according to the instructions provided by the manufacturer. In brief, 1 ml of Cleanascite™ was added to 4 ml of serum (1:4 v/v), samples were gently mixed for 10 min at room temperature, lipid's agglomeration was improved by incubation at 4°C for 1 h, samples were centrifuged at 1000 g for 15 min at 4°C, and then, the supernatants were pooled and filtered with a 0.22 µm filter.

Aliquots from the whole and the delipidated estrous sheep serum (five samples of each group, same batch) were analyzed for Triglycerides, total Cholesterol, and NEFAs by using the commercial kits TG color GPO/PAP AA, Colestat enzimático (Wiener Lab, Rosario, Argentina), and NEFA-HR (2) (Wako Chemicals USA, Inc., Richmond, VA, USA), respectively. All enzymatic colorimetric assays were performed according to the manufacturer's instructions. Measurements were obtained with a biochemical analyzer (Vitalab Selectra-2 Merck, Darmstadt, Germany). The lipid removal efficiency was 54.4% for total cholesterol, 21.2% for triglycerides and 30.6% for NEFAs. For this reason, delipidated serum was in fact partially delipidated. Data presented on Table 1 show the mean values and inter-assay coefficient of variation (CV) for each metabolite.

Oocyte collection

Sheep ovaries were collected from the slaughterhouse and transported to the laboratory within 1 h in saline solution with 50 IU/ml of Penicillin and 50 µg/ml of Streptomycin at 35–37°C. The COCs were aspirated from antral follicles (2 to 6 mm) using a 21 gauge needle and a 5 ml syringe containing 0.5 ml of collection medium containing HEPES-buffered Tissue Cultured Media 199 (TCM 199) supplemented with 5 IU/ml of Heparin, 50 IU/ml of Penicillin, 50 µg/ml of Streptomycin, and 0.3% fatty acid-free Bovine Serum Albumin (BSA). Only COCs

Table 1. Lipid content of whole and delipidated estrous sheep serum (prior to be added to maturation medium).

	Control whole serum (mmol/L)	CV (%)	Delipidated serum (mmol/L)	CV (%)
Triglyceride	0.283 ± 0.01	5.150	0.223 ± 0.001	11.2236
Total cholesterol	1.80 ± 0.00	0.000	0.820 ± 0.007	6.061
Non-esterified fatty acid	0.718 ± 0.003	7.223	0.498 ± 0.017	3.433

Values are Means ± SD of 5 measurements of the same serum batch.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198742.t001>

surrounded with three or more layers of granulosa cells and with homogeneous cytoplasm were selected for maturation purposes.

***In vitro* maturation (IVM)**

Embryo production was performed according to the standard operative procedures of our laboratory using the method described by Menchaca et al. (2016) [3]. Briefly, selected COCs were washed three times in a washing medium containing TCM 199 + HEPES supplemented with 50 IU/ml of Penicillin, 50 µg/ml of Streptomycin, and 0.3% fatty acid-free BSA. Groups of 25–30 COCs were placed into 100 µl droplets of maturation medium under mineral oil at 39°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air for 22–24 hours. For IVM, the medium was supplemented with either 10% estrous sheep serum (whole or delipidated), 10 µg/ml FSH, 10 µg/ml LH, 100 µM Cysteamine, 50 IU/ml Penicillin, and 50 µg/ml of Streptomycin.

***In vitro* fertilization (IVF)**

COCs were removed from maturation drops and washed three times in IVF medium consisting of synthetic oviduct fluid (SOF), 2% estrous sheep serum, 10 µg/ml Heparin, and 10 µg/ml Hypotaurine. For fertilization (Day 0), frozen semen from a single ram previously frozen and tested in our lab for IVF was used. Motile spermatozoa were obtained by swim-up method [28] with slight modifications. COCs were placed into 100 µl of IVF medium, covered with mineral oil and inseminated with 1 × 10⁶ spermatozoa/drop. *In vitro* fertilization was carried out at 39°C in 5% CO₂ with humidified atmosphere for 22 hours.

***In vitro* culture (IVC)**

Presumptive zygotes were denuded by gentle pipetting and were washed three times in drops of culture medium (SOFaaBSA bicarbonate buffered) containing 5% (v/v) Basal Medium Eagle (BME)-essential amino acids, 2.5% (v/v) Minimum Essential Medium (MEM)-nonessential amino acids, and 4 mg/ml of BSA. Embryonic development took place in a humidified atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ at 39°C and the medium was renewed on Day 3 and Day 6 [3]. The percentage of cleaved embryos on Day 2 was recorded (2–8 cell embryos/total oocytes). Development rate on Day 6 (number of morulae and blastocysts) and on Day 8 (number of blastocysts) were expressed on the basis of number of presumptive zygotes at the onset of IVC. Percentage of hatching blastocysts on Day 8 (hatching rate) was determined on the basis of the total number of blastocysts on the same day.

Oocyte-vitrification and warming procedure

For the experimental groups submitted to vitrification (Experiment 2 and 3), cryopreservation was performed using the Cryotop method first described by Kuwayama et al. (2005)[29]. This method was performed using methodology and media previously reported by our group

[14,15]. Following IVM, COCs were mechanically denuded by exposure to 0.1 mg/ml of hyaluronidase at 37°C for 30 seconds through pipetting using a 200 µl pipette tip. Partially denuded COCs were washed three times in a washing medium. Oocytes were first equilibrated at room temperature for 15 min in TCM 199 medium supplemented with 20% Fetal Bovine Serum (FBS), Basic Solution (BS) containing 7.5% (v/v) Ethylene Glycol (EG) and 7.5% (v/v) Dimethyl sulfoxide (DMSO), referred to as Equilibrium Solution (ES). Four oocytes were equilibrated at the same time. They were checked for recovery of the initial shape before the vitrification step. Following equilibration, oocytes were placed in a Vitrification Solution (VS) containing BS supplemented with 15% (v/v) EG, 15% (v/v) DMSO, and 0.5 M Sucrose. After 90 s in this solution, oocytes were placed on the Cryotop device (Kitazato Biopharma, Fujinomiya, Japan) in a minimum volume (e.g. <0.1 µl) and immediately submerged in liquid nitrogen. No more than four oocytes were loaded per Cryotop device. For warming, the Cryotop was removed from the liquid nitrogen and instantly placed in a solution containing BS plus 1.0 M sucrose at 37°C. After 1 minute, the oocytes were transferred to a solution consisting of BS plus 0.5 M Sucrose for 3 minutes at RT. Finally, a 5minute wash followed by a 1 minute wash was performed with BS at RT. The oocytes were then placed in IVM medium at 39°C with 5% CO₂ humidified atmosphere for 2 h before IVF to allow microtubule repolymerization [30].

Lipid droplet staining

In Experiment 1 and 2, BODIPY 493/503 dye (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), which stains intracellular neutral lipids, was used to localize LD. The neutral lipid dye BODIPY493/503 has been used to demonstrate differences in oocyte lipid content on a variety of species including mice, cows, sheep, pigs, and humans [8]. The methodology previously described for bovine oocytes was followed with few modifications [31]. COCs were partially denuded by exposure to 0.1 mg/ml of Hyaluronidase at 37°C for 30 s through pipetting using a 200 µl tip. Oocytes were washed three times in serum-free Polyvinylpyrrolidone in Phosphate-buffered saline (PBS-PVP; 0.2% w/v). COCs were fixed in 4% paraformaldehyde at 37°C for 1 h and washed twice in PBS-PVP. Oocytes were allowed to permeate for 30 min in PBS containing 0.1% (w/v) Saponin, 0.1 M Glycine (PBS-S). The DNA was stained with 10 µg/ml of TO-PRO-3 (Molecular Probes, Eugene, OR) for 20 min and subsequently washed in PBS-S. Next, LDs were stained with BODIPY 493/503 in PBS (20µg/ml) for 1 h in the dark, and oocytes were washed three times in PBS-PVP. Oocytes were then placed on a glass slide covered with 80% glycerol (in PBS) and sealed with a microscope slide.

Lipid droplet determinations

Lipid droplet content was determined in Experiment 1 and 2. Images of oocytes were obtained using a confocal laser scanning microscope (Model LSM 800; Zeiss, Thornwood, NY, USA) attached to an inverted microscope (Model AxioObserver Z1; Zeiss, Thornwood, NY, USA) at 25X magnification. BODIPY 493/503 and TO-PRO-3 were subsequently excited with diode 488 nm lasers and diode 640nm laser. Emitted light was selected with emission detection wavelengths ranges for BODIPY 410–617 nm and for TOPRO-3 645–700 nm. Images were reconstructed using ZEN 2.1 software (Blue edition). From the *in vitro* matured groups only metaphase II stage oocytes were analyzed for lipid determination. Using ImageJ v.1.44g software, sum slices Z-projection was generated to a stack of images, same number of slices was used for each projection created (from 1 to 30 endpoint slice). The BODIPY fluorescence (arbitrary units of fluorescence) in the oocyte was determined after selection of the area covering entire ooplasm and the background region of each partially denuded oocyte [4]. After

background correction Integrated density (Int Den) was calculated using Image J v.144- software. Finally IntDen mean $\pm$ SEM for each experimental group was determined.

RNA isolation and reverse transcription

For RNA isolation, 30–35 COCs from each group of Experiment 3 (Immature, Control whole serum group, Delipidated serum group, Control whole serum + vitrification group, and Delipidated serum + vitrification group) were denuded, washed in PBS, and placed into a 1.5 ml microcentrifuge tube. The tubes were immediately submerged in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction. Total RNA was isolated using the RNeasy Plus Micro Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The extracted RNA concentration and purity was estimated using a ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Delaware USA). Sample purity was assessed using the A260/ A280nm ratio with expected values between 1.8 and 2.0. Reverse transcription was carried out with 50ng of total RNA using SuperScript®III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen™) and a random hexamer primer in a final reaction volume of 10 μl according to the manufacturer's instructions. The cDNA synthesis reactions were carried out at 25°C for 5 min for annealing, 50°C for 50 min for extension, followed by enzyme heat inactivation at 85°C for 5 min.

Real-time polymerase chain reaction

For Experiment 3, gene expression was assessed by quantitative real-time PCR (qPCR). Oligonucleotide primers were designed for *GRP78*, *CHOP10*, *ATF4*, and *ATF6* using NCBI Primer Blast. Genes were selected as markers of activation of UPR, signaling branch activated under ER stress[32]. The primer sequences for *PPIA* and *TUBB* were taken from a published report where those genes were found most stable for normalization when random hexamers were used for cDNA priming in ovine oocytes [33]. Expected fragment size and GenBank accession numbers are listed on Table 2. All primers were synthesized by IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA). The PCR mix in each include 5 μl of Power SYBR Green PCR Mix (2X) (Applied Biosystems, UK), 2 μl of nuclease-free water, 1 μl of each forward and reverse primer pair (10 μM), and 1 μl of cDNA in a final volume of 10 μl . The PCR was carried out on an Eco™ Real-time PCR System (Illumina, San Diego, USA). The program used for the

Table 2. Details of oligonucleotides used for qPCR.

Gene symbol	Gene name	Primer sequence	Product Size (bp)	Accession number
<i>PPIA</i>	Peptidylprolyl isomerase A	F: ATTTATGTGCCAGGTTGGTG	158	AY251270
		R: ACTGGGAACCATTTGTGTTGG		
<i>TUBB</i>	Beta-tubulin	F: CAGAGCAAGAACAGCAGCTACTT	228	AF035420
		R: GTGAACTCCATCTCGTCCATGCCCTC		
<i>ATF4</i>	Activating Transcription Factor 4	F: CGAGGTGTTTGTGGGGGACT	149	GAAI01000637.1
		R: AGGAGCCTGCCTTAGCCTTG		
<i>ATF6</i>	Activating Transcription Factor 6	F: GCTCTCTCAGCCTACCGTGG	130	AY942654.1
		R: CACAGGGGCTGGTACCACAT		
<i>GRP78 (HSPA5)</i>	Glucose regulated protein-78	F: AGCCCTATAGCTGCCTGCTG	131	DQ029323.1
		R: CCACGTCCTCCTTCTGTGTC		
<i>CHOP10 (DDIT3)</i>	C/EBP homologous protein	F: TGGAAGCCTGGTATGAGGAC	126	AY943948.1
		R: GAGAGGCAGGTCAGAGTG		

F, forward primer; R, reverser primer

Product size in base pairs.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198742.t002>

amplification of the genes consisted of an enzyme activation step of 10 min at 95°C followed by 45 cycles of PCR of a 15s denaturation at 95°C, 60 s annealing/extension at 60°C and a dissociation step consisting of 95°C for 15 s, 60°C for 15 s and finally 95°C for 15 s. At the end of the PCR reactions, melt curve analyses were performed for all genes to confirm the integrity of PCR products and specificity by the presence of a single peak. All samples were run in duplicate and mean value was used for calculations. Standard curves were created for each gene using a 3-fold dilution of cDNA and used to calculate individual real time PCR efficiencies (E) according to the formula $\%E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ [34]. The data generated by Eco Real-Time PCR System Software v5.0 (Illumina, CA, USA) were transferred to Microsoft Excel for analysis.

All target gene transcriptions were expressed as an n-fold difference relative to the calibrator (Control serum group). Different amplification efficiencies for individual genes were considered [35]. The geometrical mean of two internal reference genes (*TUBB* and *PPIA*) was used to correct the raw values for the genes of interest.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Infostat software (Cordoba, Argentina). The criterion of data normality was evaluated by the Shapiro-Wilk test and percentage data was subjected to arcsine transformation and expressed as Mean $\pm$ SEM. Significance differences in Experiment 1 were tested by a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test when variables were normally distributed. A non-parametric Kruskal-Wallis test was conducted for comparison of variables that did not follow normal distribution. For Experiment 2 and 3, in which 2x2 factorial design was performed, mixed models were used with fixed effect for cryo-preservation (vitrification or not), serum (whole or delipidated) and its interaction, and the replicate as random effect (13 replicates for Experiment 2 and seven replicates for Experiment 3). Values of p less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Experiment 1

The lipid content of immature oocytes measured soon after follicular aspiration was 9.9 ± 2.9 (expressed as the mean fluorescence intensity). After maturation, the lipid droplet content in oocytes cultured in medium containing whole estrous serum increased more than twofold compared to immature oocytes (22.8 ± 5.0 ; $P < 0.05$). In contrast, oocytes that were matured in medium containing delipidated estrous serum showed a significantly lower content of lipid droplets (7.6 ± 1.7 ; $P < 0.05$), which was similar to the levels measured in immature oocytes ($P = \text{NS}$). Fig 2 shows the results of lipid droplet localization and quantification of immature, control whole, and delipidated *in vitro* matured COCs after BODIPY 493/503 staining. Differences found in the oocyte neutral lipid content did not influence subsequent embryo development (Table 3). No significant differences ($P = \text{NS}$) were observed in the cleavage rate, developmental rates on Day 6 and Day 8, or hatching rate between groups.

Experiment 2

Oocyte lipid content assessed by LD staining before and after vitrification are shown in Fig 3. Lipid droplets in oocytes exhibited reduced fluorescence after vitrification when matured *in vitro* with either medium supplemented with control whole serum or delipidated serum. Despite IVM treatment, oocytes subjected to vitrification exhibited reduced competence after *in vitro* fertilization and culture, with lower cleavage rate, embryo development rates on Day 6

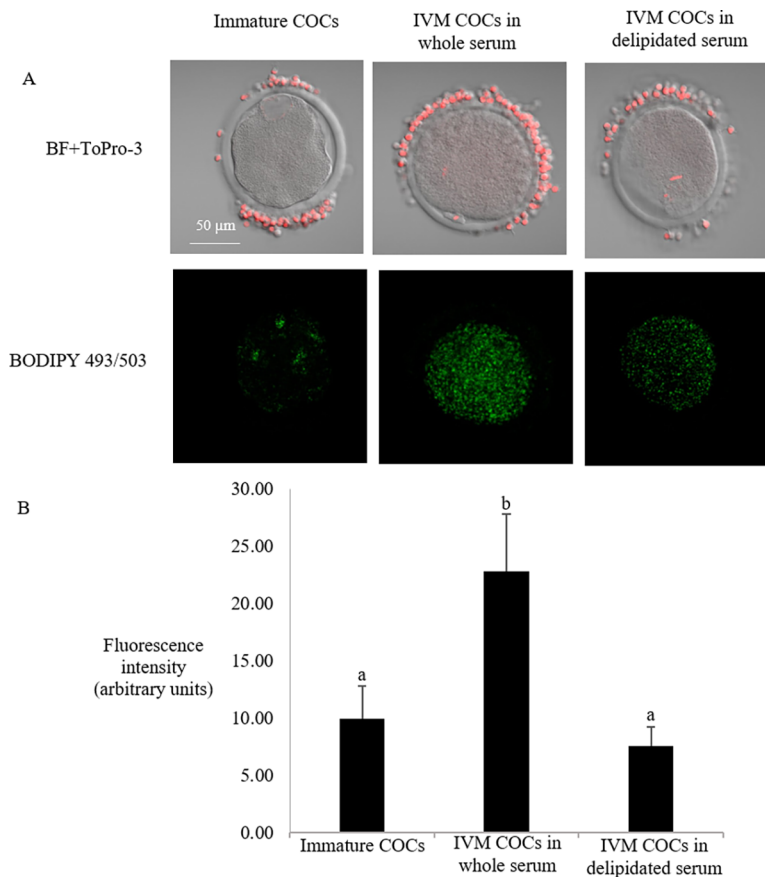


Fig 2. Lipid quantification of partially denuded COCs *in vitro* matured with control whole serum or delipidated serum (Experiment 1). a) Nuclei of cells were stained with ToPro-3 (red) and merged with bright field image (BF). Neutral lipid staining with BODIPY 493/503 (green) show an increase in lipid droplets of oocytes after exposure to IVM media supplemented with control whole serum. b) Comparison of the lipid content of immature (Immature, $n = 23$) and COCs in vitro matured in a medium supplemented with control whole ($n = 24$) or delipidated ($n = 24$) estrous sheep serum. Values are expressed as average of BODIPY fluorescence intensity in the ooplasm per area $\pm$ SEM. a vs b indicates significant differences ($P < 0.05$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198742.g002>

and Day 8, and hatching rate when compared with the non-vitrified oocytes ($P < 0.05$). No significant differences ($P = \text{NS}$) were found among non-vitrified groups, which is in agreement with the results obtained in Experiment 1 (serum effect: whole vs. delipidated). No interaction between vitrification and the type of serum (whole or delipidated) were found for cleavage, embryo development, and hatching rates ($P = \text{NS}$) (Table 4).

Table 3. *In vitro* ovine embryo development after maturation of COCs supplemented with control whole or delipidated estrous sheep serum (Experiment 1, seven replicates).

	Oocytes (n)	Day 2 Cleavage rate (%)	Day 6 Morulae and blastocysts (%)	Day 8 Blastocysts (%)	Day 8 Hatching rate (%)
Control whole serum	452	69.1 $\pm$ 7.3	33.4 $\pm$ 4.9	27.0 $\pm$ 6.9	44.6 $\pm$ 9.9
Delipidated serum	414	70.8 $\pm$ 7.3	31.9 $\pm$ 4.2	29.8 $\pm$ 6.2	50.4 $\pm$ 13.2

$P = \text{NS}$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198742.t003>

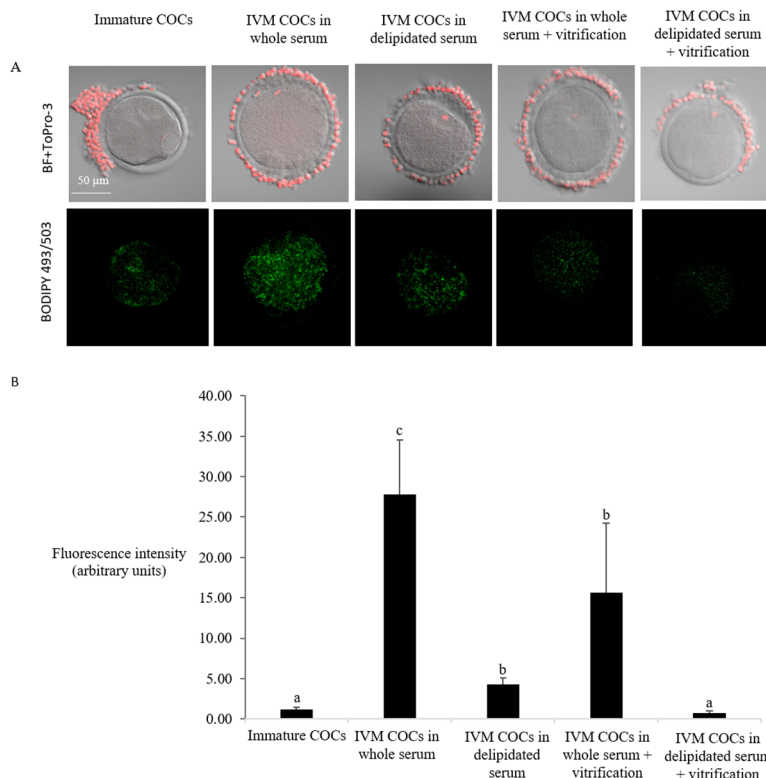


Fig 3. Effect of vitrification on lipid droplet content of partially denuded COCs after IVM under different lipid content conditions (Experiment 2). a) Nuclei of cells were stained with ToPro-3 (red) and merged with bright field image (BF). Neutral Lipid staining with BODIPY 493/503 (green) shows a decrease in lipid droplets of oocytes after vitrification. b) Comparison of the lipid content of immature (Immature, n = 12) versus IVM COCs in a medium supplemented with control whole (n = 16) or delipidated estrous sheep serum (n = 19) before or after vitrification (control whole serum+ vitrification group, n = 12; Delipidated serum+ vitrification n = 11). Values are expressed as average of BODIPY fluorescence intensity in the ooplasm per area $\pm$ SEM. Different superscripts indicate significant differences ($P < 0.05$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198742.g003>

Experiment 3

The expression of ER stress genes was affected by the serum type used during IVM of COCs as well as by the vitrification/warming process, with interaction between both main effects ($P < 0.05$). The expression of classic ER stress markers (*ATF4*, *ATF6*, *GRP78*, and *CHOP10*)

Table 4. *In vitro* embryo development of ovine oocytes subjected to IVM under different lipid content conditions induced by supplementation of whole or delipidated serum followed by vitrification (Experiment 2).

	Oocytes (n)	Day 2 Cleavage rate (%)	Day 6 Morulae and blastocysts (%)	Day 8 Blastocysts (%)	Day 8 Hatching rate (%)
Main effect: Lipid content					
Control whole serum	632	53.3 $\pm$ 6.3 ^a	34.7 $\pm$ 4.6 ^a	22.4 $\pm$ 4.5 ^a	24.6 $\pm$ 6 ^a
Delipidated serum	648	54.6 $\pm$ 6.2 ^a	34.6 $\pm$ 4.4 ^a	21.9 $\pm$ 4.3 ^a	29.2 $\pm$ 6.5 ^a
Main effect: vitrification					
No vitrification	579	80.3 $\pm$ 2.9 ^a	53.8 $\pm$ 2.4 ^a	41.71% $\pm$ 2.6 ^a	48.68 $\pm$ 4.9 ^a
Vitrification	701	27.2 $\pm$ 3.6 ^b	15.5 $\pm$ 2.4 ^b	2.7% $\pm$ 0.9 ^b	5.1 $\pm$ 4.0 ^b
Vitrification*serum interaction	NS	NS	NS	NS	NS

For the same column within main or simple effects, a vs. b differ ($P < 0.05$)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198742.t004>

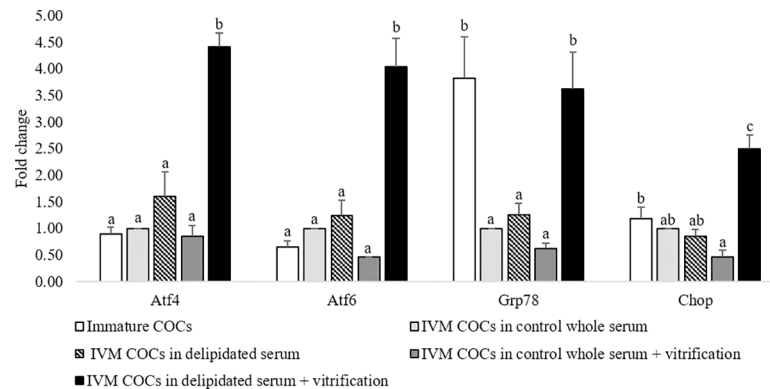


Fig 4. Expression of endoplasmic reticulum (ER) stress genes induced in cumulus oocytes complexes (COCs) submitted to *in vitro* maturation (IVM) in whole or delipidated serum with subsequent vitrification. Total RNA was extracted from denuded COCs, and expression of ER stress marker genes (*ATF4*, *GRP78*, *ATF6* and *CHOP10*) was determined by qPCR. Gene expression of 5 experimental groups, interaction was found when COCs were matured in delipidated serum and subsequently vitrified. Within the same gene, different letters indicates significant differences ($P < 0.05$). Mean $\pm$ SEM is expressed as fold change compared with calibrator sample (control whole serum).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198742.g004>

examined in COCs exposed to IVM media supplemented with control whole or delipidated serum and either submitted to vitrification or not is shown in Fig 4. The COCs matured in delipidated serum and subjected to vitrification exhibited increased expression of *ATF4* (4.4 fold), *ATF6* (4.0 fold), *GRP78* (3.6 fold), and *CHOP10* (2.5 fold) compared with COCs matured in IVM media supplemented with control whole serum (calibrator sample). No significant differences ($P = NS$) were found in the expression levels of those ER stress markers in COCs matured in control whole serum and subject to vitrification (control whole serum + vitrification group). COCs matured in delipidated serum (non-vitrified group) exhibited similar expression levels of the four ER stress markers respect to the control whole serum group. These results demonstrate that vitrification induces ER stress in COCs when they are previously matured *in vitro* in medium deprived of lipids.

Discussion

The current study demonstrates that COCs matured *in vitro* in medium supplemented with delipidated estrous sheep serum contain fewer cytoplasmic lipid droplets than those matured in medium supplemented with whole estrous serum. However, reduced numbers of cytoplasmic lipid droplets did not improve oocyte competence and embryo production in fresh and vitrified oocytes. While the vitrification process impairs oocyte developmental competence, the serum type (delipidated or whole) used during IVM did not appear to have any adverse effects. Notably, mRNA expression levels of ER stress genes increased significantly after vitrification of oocytes but only when maturation was performed with medium supplemented with delipidated serum.

We found that the standard method used for *in vitro* maturation of COCs with a medium supplemented with whole estrous sheep serum increased oocyte neutral lipid content in comparison with immature oocytes. This increase was prevented by serum delipidation, since oocytes subjected to IVM medium with partially delipidated serum had less lipid droplets than COCs matured in control whole serum. Lipid droplets are intracellular sites of neutral lipid storage, which have been shown to play an important role in the metabolism of lipids and cellular energy homeostasis [36]. During *in vitro* maturation, serum lipids are incorporated into the oocyte cytoplasm [37], with the presence of lipids in culture media causing an increase in

the number of lipid droplets in the produced embryos [38]. Although lipid droplets play a pivotal role during oocyte maturation, since oxidative phosphorylation is the main pathway to produce ATP [7], high accumulation of lipid droplets content has been correlated with poorer cryosurvival rates and reduced development competence of oocytes [39]. In this study, we demonstrate that *in vitro* maturation of COCs in medium containing whole estrous serum increase lipid accumulation in matured oocytes, a finding that could be important for oocyte cryotolerance and embryo development.

Studies show that high lipid content in IVM oocytes correlates with reduced cryotolerance, therefore different strategies have been used to reduce numbers of lipid droplets in oocytes. One way to regulate the lipid content is the use of serum free media, which contains restricted nutrients, during IVM [1]. However, efforts to reduce lipid content in the oocytes and embryos, have been met with limited success and resulted in lower oocyte competence [40], [41]. Unlike other approaches, the protocol described herein for delipidation of estrous sheep serum was effective in decreasing levels of Triglycerides, total Cholesterol, and NEFAs. To our knowledge this is the first study to use the Cleanascite HC method to generate estrous sheep serum yielding significantly reduced lipid levels. Subsequent use of the partially delipidated serum as supplemented in IVM media resulted in effective reduction of oocyte lipid content. The advantage of this method over other traditional methods (i.e. chloroform) includes increased feasibility and reduced toxicity and biosafety concerns [42]. Similar results have been found when oocyte delipidation is achieved by stimulating lipid metabolism (i.e. L-Carnitine) [43]. The approach of encouraging embryos and oocytes to deplete intracellular lipids to increase cryosurvival rates has been shown to be a more benign alternative to mechanical delipidation and safer for oocytes and embryos [1]. Furthermore, our protocol enables simultaneous delipidation of large numbers of oocytes and does not require micromanipulation, thereby increasing efficiency and improving viability of oocytes.

The current study shows that oocyte competence was affected by cryopreservation independently of the lipid environment in which the COCs were matured. Cryopreservation protocols are not well established for oocytes, especially in domestic animals due to their high lipid content [44]. Ultra-rapid vitrification methods have made it possible to overcome some challenges associated with oocyte cryopreservation. Specifically, the use of Cryotop with minimum volume of vitrification ($<0.1 \mu\text{l}$) and high cooling rates ($22,800^\circ\text{C min}^{-1}$) has allowed human oocytes to obtain post-warming survival rates of $>90\%$ and blastocyst rates of roughly 50% [29]. Compared to human oocytes, oocytes from some species of domestic animals have high lipid content which increases their sensitivity to cooling processes and exacerbates outcomes after IVM [1]. Overall, species that have higher lipid content in their ooplasm have lower survival rates following cryopreservation [39]. As expected, we found that vitrified oocytes that had been in IVM medium containing whole serum showed reduced cleavage rates and embryo development compared to fresh control oocytes that were not subjected to vitrification. Interestingly, although incorporation of partially delipidated serum in the IVM medium resulted in lower lipid content in the matured oocytes, it did not improve outcomes after vitrification including cleavage rates and embryo development rates in comparison to IVM oocytes with control whole serum medium. Collectively, our results show that reducing lipid content during the COC maturation process prior to cryopreservation is not sufficient to improve oocyte competences following, suggesting that lipid content is one factor amongst many variables/factors that can lead to reduced tolerance to cryopreservation. Some studies attribute the lower cryotolerance of *in vitro* produced embryos to an imbalance of oxidation-reduction metabolism leading to greater accumulation of reactive oxygen species in the culture medium and reduced survival rates of embryos [45]. Our current results suggest that a negative correlation exists between lipid content and oocyte cryotolerance. It is well known that embryos derived

from live animals have fewer lipid droplets compared to IVP embryos [46]. This difference in lipid neutral content may explain, in part, the differences in cryotolerance between *in vivo* versus *in vitro* embryos [1]. Some studies have reported similar differences in bovine and porcine oocytes matured *in vivo* vs. *in vitro* [47,48]. These observations support the idea that if IVM oocytes in delipidated systems could resemble *in vivo* matured oocytes in terms of lipid droplets content and that cryotolerance could be improved. However, despite the lower lipid droplet content found in those COCs subjected to IVM with partially delipidated serum, no differences in oocyte competence were found. It is likely that either the variations observed are insufficient to alter oocytes' cryotolerance to vitrification, or that a reduction of lipid droplets using our experimental conditions is not a key factor to overcome damages associated with vitrification.

Finally, we demonstrate that vitrification induces greater expression of ER stress genes in COCs matured in a medium with reduced lipid content. The ER folding capacity can be disturbed by biological stimuli, resulting in an accumulation of misfolded and unfolded proteins in the ER lumen and ER stress [32]. ER stress triggers a homeostasis response, referred to as the unfolded protein response (UPR) [49], which involves the activation of ER transmembrane signaling molecules (PERK, IRE1 and ATF6). Activation of these three master regulators of UPR influence the transcription of several genes involved in UPR. IRE1 α regulates the splicing of XBP1 promoting components of ER-associated protein degradation (ERAD) as Bip/GRP78. Activation of PERK favor translation of ATF4, which regulates genes involved in protein folding, degradation, and apoptosis, including CHOP. In this study, we have selected downstream regulators *ATF4*, *CHOP*, and *GRP78* as representative genes of the PERK/IRE1 pathway to determine UPR activation [32]. Differences in the expression levels of UPR genes has been related with lipid droplet content in mice and expression of *GRP78* is greater when oocytes are matured *in vivo* [50]. Lipid peroxidation has also been linked to induction of UPR in endothelial cells [51] and augmentation in the expression levels of *XBP1* has been reported in vitrification-warmed mouse oocytes [12]. Our data revealed that *GRP78* is expressed highly in immature sheep oocytes compared to COCs that were matured *in vitro*. No significant differences were found in the expression levels of *ATF4*, *ATF6*, *GRP78*, and *CHOP10* in COCs that were matured *in vitro*—either in whole serum or in delipidated serum. Attenuation in the expression levels of *GRP78* in *in vitro* matured COCs could be a consequence of FSH supplementation in the IVM media as reported previously for mice [52]. COCs that were matured *in vitro* in IVM media supplemented with delipidated serum and vitrification upregulated the expression of *ATF4*, *ATF6*, *CHOP10*, and *GRP78*. It has been previously suggested that lipid droplets may serve as a site of storage to sequester unfolded or excessive proteins, thereby alleviating ER stress [53]. Therefore, the amount of lipid droplets in COCs matured in whole serum and vitrified reduced their sensitivity to ER stress induction post-warming. Another possible explanation for our results, is that oocyte competence is regulated by adaptive machineries governed by ER stress. Various genes associated with ER stress were found in oocytes and preimplantation embryos of mice and pigs, as a normal part of preimplantation embryos adaptive machineries [54,55]. However, some studies oppose the notion that the UPR response promotes oocyte competence. The inhibition of the UPR response by different inhibitors (TUDCA or Salubrinal) was shown to enhance maturation of pig and mouse oocytes by preventing ER stress mediated apoptosis *in vitro* [24,55], suggesting that ER stress may negatively impact oocyte developmental competence. To our knowledge, this is the first time that expression of the *ATF4*, *ATF6*, *CHOP10*, and *GRP78* genes has been evaluated in ovine oocytes. We demonstrate that vitrification can cause activation of UPR when oocytes are diminished in lipid droplets content.

In conclusion, this study demonstrates that partial delipidation of estrous sheep serum used for supplementation of IVM medium reduces the neutral lipid content and the presence of cytoplasmic lipid droplet in oocytes. However, the culture of oocytes in delipidated serum did not result in improved cryotolerance when *in vitro* matured oocytes were subjected to vitrification. COCs with reduced amounts of lipid droplets subjected to vitrification were observed to have higher expression of UPR genes. Overall, this study provides a feasible method to reduce lipid droplets in oocytes that are *in vitro* matured, and suggests the need of a revision of the idea that oocyte cryotolerance may be improved by lipid content depletion.

Acknowledgments

The authors thank Victoria de Brun and Marcela Díaz for their technical support. The authors would also like to thank Dr. Stephan du Plessis and Dr. Sumantha Bhatt for their help in preparing this manuscript. This study received financial support of Union Agriculture Group (UAG) and Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII; POSNAC201311217). AM and MC are fellows of Sistema Nacional de Investigadores (SNI) and PEDECIBA.

Author Contributions

Conceptualization: Natalibeth Barrera, Ana P. Mulet, Alejo Menchaca.

Data curation: Natalibeth Barrera.

Formal analysis: Natalibeth Barrera.

Investigation: Pedro C. dos Santos Neto, Federico Cuadro, Ana P. Mulet.

Methodology: Natalibeth Barrera, Federico Cuadro, Diego Bosolasco, Ana P. Mulet.

Project administration: Natalibeth Barrera.

Supervision: Martina Crispo, Alejo Menchaca.

Validation: Martina Crispo, Alejo Menchaca.

Writing – original draft: Natalibeth Barrera, Alejo Menchaca.

Writing – review & editing: Martina Crispo.

References

1. Wirtu G, McGill J, Crawford L, Reddy G, Bergen WG, Simon L. Targeting Lipid Metabolism to Improve Oocyte Cryopreservation (OCP) in Domestic Animals. 2013; 1:15–20.
2. Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. Anim. Reprod. Sci. 2000;60–61:357–64.
3. Menchaca A, Barrera N, Santos PC dos, Cuadro F, Crispo M. Advances and limitations of *in vitro* embryo production in sheep and goats. Anim. Reprod. [Internet]. 2016; 13:273–8. Available from: [http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v13/v13n3/p273-278\(AR871\).pdf](http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v13/v13n3/p273-278(AR871).pdf)
4. Lonergan P, Fair T. Maturation of Oocytes in Vitro. Annu. Rev. Anim. Biosci. United States; 2016; 4:255–68. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-110822> PMID: 26566159
5. Wrenzycki C, Stinshoff H. Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes. Reprod. Domest. Anim. Germany; 2013;48 Suppl 1:38–43.
6. Collado-Fernandez E, Picton HM, Dumollard Ré. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. Int. J. Dev. Biol. 2012; 56:799–808. <https://doi.org/10.1387/ijdb.120140ec> PMID: 23417402
7. Sturmey RG, Leese HJ. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. Reproduction. 2003; 126:197–204. PMID: 12887276

8. Dunning KR, Russell DL, Robker RL. Lipids and oocyte developmental competence: The role of fatty acids and β -oxidation. *Reproduction*. 2014;148.
9. Listenberger LL, Brown D a. Fluorescent detection of lipid droplets and associated proteins. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 2007;Chapter 24:Unit 24.2.
10. 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.* [Internet]. John Wiley & Sons, Inc.; 2002; 61:57–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1131> PMID: 11774376
11. Ferguson EM, Leese HJ. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J. Reprod. Fertil.* 1999; 116:373–8. PMID: 10615263
12. Zhao N, Liu XJ, Li JT, Zhang L, Fu Y, Zhang YJ, et al. Endoplasmic reticulum stress inhibition is a valid therapeutic strategy in vitrifying oocytes. *Cryobiology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2015; 70:48–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.12.001> PMID: 25499542
13. Zhou G Bin, Li N. Cryopreservation of porcine oocytes: Recent advances. *Mol. Hum. Reprod.* 2009. p. 279–85. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap016> PMID: 19251762
14. dos Santos Neto PC, Vilariño M, Barrera N, Cuadro F, Crispo M, Menchaca A. Cryotolerance of Day 2 or Day 6 *in vitro* produced ovine embryos after vitrification by Cryotop or Spatula methods. *Cryobiology*. 2015;
15. dos Santos-Neto PC, Cuadro F, Barrera N, Crispo M, Menchaca A. Embryo survival and birth rate after minimum volume vitrification or slow freezing of *in vivo* and *in vitro* produced ovine embryos. *Cryobiology*. 2017; 78:8–14. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.08.002> PMID: 28803846
16. Shirazi A, Naderi MM, Hassanpour H, Heidari M, Borjian S, Sarvari A, et al. The effect of ovine oocyte vitrification on expression of subset of genes involved in epigenetic modifications during oocyte maturation and early embryo development. *Theriogenology* [Internet]. Elsevier Inc; 2016; 86:2136–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.005> PMID: 27501872
17. Bhat MH, Yaqoob SH, Khan FA, Waheed SM, Sharma V, Vajta G, et al. Open pulled straw vitrification of *in vitro* matured sheep oocytes using different cryoprotectants. *Small Rumin. Res.* 2013; 112:136–40.
18. Bhat MH, Sharma V, Khan FA, Naykoo NA, Yaqoob SH, Vajta G, et al. Open pulled straw vitrification and slow freezing of sheep IVF embryos using different cryoprotectants. *Reprod. Fertil. Dev.* 2015; 27:1175–80. <https://doi.org/10.1071/RD14024> PMID: 24871337
19. Mullen SF, Fahy GM. A chronologic review of mature oocyte vitrification research in cattle, pigs, and sheep. *Theriogenology*. 2012. p. 1709–19.
20. Hwang IS, Hochi S. Recent progress in cryopreservation of bovine oocytes. *Biomed Res. Int.* 2014;2014.
21. Shabankareh HK, Zandi M. Developmental potential of sheep oocytes cultured in different maturation media: effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, and cysteamine. *Fertil. Steril.* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010; 94:335–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.01.160> PMID: 19324348
22. Du Y, Pribenszky CS, Molnár M, Zhang X, Yang H, Kuwayama M, et al. High hydrostatic pressure: A new way to improve *in vitro* developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification. *Reproduction*. 2008; 135:13–7. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0362> PMID: 18159079
23. Pribenszky C, Lin L, Du Y, Losonczi E, Dinnyes A, Vajta G. Controlled stress improves oocyte performance—cell preconditioning in assisted reproduction. *Reprod. Domest. Anim. Germany*; 2012; 47 Suppl 4:197–206.
24. Wu LL, Russell DL, Norman RJ, Robker RL. Endoplasmic reticulum (ER) stress in cumulus-oocyte complexes impairs pentraxin-3 secretion, mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$ m), and embryo development. *Mol. Endocrinol.* [Internet]. 2012; 26:562–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22383462> PMID: 22383462
25. Gordon I. Laboratory production of cattle embryos 2nd edition. CAB Int. Univ. Press. 2003.
26. Leroy J, Genicot G, Donnay I, Van Soom A. Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with Nile red: a practical approach. *Reprod. Domest. Anim.* 2005; 40:76–8. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00556.x> PMID: 15655006
27. Menchaca A, Rubianes E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 2004; 16:403–13. <https://doi.org/10.10371/RD04037> PMID: 15315739
28. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*. United States; 1986; 25:591–600. PMID: 16726150

29. Kuwayama M, Kato O, Leibo SP, Genetics P. Article Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Biomedicine*. 2005; 11:300–8.
30. Tamura AN, Huang TTF, Marikawa Y. Impact of vitrification on the meiotic spindle and components of the microtubule-organizing center in mouse mature oocytes. *Biol. Reprod.* [Internet]. 2013; 89:112. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24025740> PMID: 24025740
31. Aardema H, Vos PL a M, Lolicato F, Roelen B a J, Knijn HM, Vaandrager AB, et al. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. *Biol. Reprod.* [Internet]. 2011; 85:62–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21311036> PMID: 21311036
32. Osowski CM, Urano F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol.* [Internet]. 2013; 490:71–92. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123851147000040>
33. O'Connor T, Wilmut I, Taylor J. Quantitative evaluation of reference genes for real-time pcr during *in vitro* maturation of ovine oocytes. *Reprod. Domest. Anim.* 2013; 48:477–83. <https://doi.org/10.1111/rda.12112> PMID: 23066791
34. Rutledge RG, Côté C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31:e93. PMID: 12907745
35. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* [Internet]. 2001; 29:e45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886> PMID: 11328886
36. Welte MA. Expanding roles for lipid droplets. *Curr. Biol.* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015; 25:R470–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.004> PMID: 26035793
37. Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M, Fukui Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes. *Reproduction*. 2001; 122:131–8. PMID: 11425337
38. Leroy J, Genicot G, Donnay I, Soom A Van. Short Communication Evaluation of the Lipid Content in Bovine Oocytes and Embryos with Nile Red: a Practical Approach. 2005; 78:76–8.
39. Prates EG, Nunes JT, Pereira RM. A role of lipid metabolism during cumulus-oocyte complex maturation: Impact of lipid modulators to improve embryo production. *Mediators Inflamm.* Hindawi Publishing Corporation; 2014;2014.
40. Accorsi MF, Leão BC da S, Rocha-Frigoni NA de S, Perri SHV, Mingoti GZ. Reduction in cytoplasmic lipid content in bovine embryos cultured *in vitro* with linoleic acid in semi-defined medium is correlated with increases in cryotolerance. *Zygote*. 2015; 24:485–94. <https://doi.org/10.1017/S0967199415000428> PMID: 26350684
41. Mishra A, Gupta PSP, Sejian V, Reddy IJ, Ravindra JP. Maturation timing and fetal bovine serum concentration for developmental potential of sheep oocytes *in vitro*. 2016; 54:630–3.
42. Castro AR, Morrill WE, Pope V. Lipid removal from human serum samples. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000; 7:197–9. PMID: 10702492
43. Dunning KR, Robker RL. Promoting lipid utilization with l-carnitine to improve oocyte quality. *Anim. Reprod. Sci.* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012; 134:69–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.08.013> PMID: 22917873
44. Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*. 2004; 48:146–56. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.03.002> PMID: 15094091
45. Sudano MJ, Paschoal DM, da Silva Rascado T, Magalhães LCO, Crocomo LF, de Lima-Neto JF, et al. Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011; 75:1211–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.033> PMID: 21247620
46. Seidel GE. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*. 2006. p. 228–35.
47. Del Collado M, Saraiva NZ, Lopes FL, Gaspar RC, Padilha LC, Costa RR, et al. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during *in vitro* maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 2016; 28:1721–32.
48. Kikuchi K, Ekwall H, Tienthai P, Kawai Y, Noguchi J, Kaneko H, et al. Morphological features of lipid droplet transition during porcine oocyte fertilisation and early embryonic development to blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Zygote*. 2002; 10:355–66. PMID: 12463532
49. Volmer R, Ron D. Lipid-dependent regulation of the unfolded protein response. *Curr. Opin. Cell Biol.* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015; 33:67–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2014.12.002> PMID: 25543896

50. Yang X, Wu LL, Chura LR, Liang X, Lane M, Norman RJ, et al. Exposure to lipid-rich follicular fluid is associated with endoplasmic reticulum stress and impaired oocyte maturation in cumulus-oocyte complexes. *Fertil. Steril.* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012; 97:1438–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.02.034> PMID: 22440252
51. Vladyskovskaya E, Sithu SD, Haberzettl P, Wickramasinghe NS, Merchant ML, Hill BG, et al. Lipid peroxidation product 4-hydroxy-trans-2-nonenal causes endothelial activation by inducing endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* 2012; 287:11398–409. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.320416> PMID: 22228760
52. Babayev E, Lalioti M D, Favero F, Seli E. Cross-talk between FSH and endoplasmic reticulum stress: A mutually suppressive relationship. *Reprod. Sci.* 2016; 23:352–64. <https://doi.org/10.1177/1933719115602770> PMID: 26342052
53. Zhang X, Zhang K. Endoplasmic reticulum stress-associated lipid droplet formation and type II diabetes. *Biochem. Res. Int.* 2012;2012.
54. Michalak M, Gye MC. Endoplasmic reticulum stress in periimplantation embryos. *Clin. Exp. Reprod. Med.* 2015; 42:1–7. <https://doi.org/10.5653/cerm.2015.42.1.1> PMID: 25874167
55. Zhang JY, Diao YF, Oqani RK, Han RX, Jin DI. Effect of Endoplasmic Reticulum Stress on Porcine Oocyte Maturation and Parthenogenetic Embryonic Development In Vitro. *Biol. Reprod.* 2012; 86:128–128. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095059> PMID: 22190710