



CRIOTOLERANCIA DE EMBRIONES BOVINOS CULTIVADOS INDIVIDUALMENTE EN UN MEDIO SUPLEMENTADO CON L-CARNITINA †

[CRYOTOLERANCE OF BOVINE EMBRYOS INDIVIDUALLY CULTURED IN A MEDIUM SUPPLEMENTED WITH L-CARNITINE]

E. R. Lliteras-Martínez¹, A. Palacios-Espinosa^{1*},
J. L. Espinoza-Villavicencio¹, R. Ortega-Pérez¹ and Peter E. J. Bols²

¹Universidad Autónoma de Baja California Sur, Km. 5.5 carretera al Sur, Colonia El Mezquitito. C.P. 23080., México. Email. palacios@uabcs.mx

²Universidad de Amberes, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Biomédicas y Veterinarias, Laboratorio de Fisiología Veterinaria. Universiteitsplein 1, Gebouw U, B-2610 Wilrijk, Bélgica.

*Corresponding author

SUMMARY

Background: L-carnitine is a lipid metabolism enhancer and a potent antioxidant that prevents oxidative damage and improves cryotolerance of bovine embryos. **Objective:** To determine the effect of L-carnitine during oocyte maturation on developmental competence and cryotolerance of single bovine embryo cultured. **Methodology:** Embryos were produced in vitro using abattoir-derived cumulus-oocyte complexes (COCs). In experiment 1, two individual maturation, fertilization and culture systems were used in 24-well plates with 20 µL drops of medium covered with mineral oil and 96-well plates with 30 µL drops of medium. In experiment 2, oocytes were randomly distributed into two groups and single matured in 96-well plates in medium supplemented or not with 0.6mg/mL L-carnitine. On day 7 post fertilization, blastocysts were vitrified on solid surface in Fiberplug. Non-vitrified blastocysts were used as control. Embryonic survival after devitrification was determined by blastocysts re-expansion and hatching rate at 24 and 48 hours of post-devitrification culture. Total cell number and apoptotic rate by TUNEL-DAPI staining were used as quality and cryotolerance indicator. In both cases, cleavage and blastocyst rates were evaluated at 48 hours and 7 days post fertilization, respectively. **Results:** No significant differences were found for embryonic development between single culture systems. There was no effect of L-carnitine supplementation during maturation on embryo development, but embryo survival had increased ($P < 0.05$) at 24- and 48-hours post devitrification. **Implications:** Treatment with L-carnitine had increased ($P < 0.05$) post-thaw re-expansion rates (86.8 ± 3.0 vs 70.0 ± 4.4) and it was similar to non-vitrified control (89.7 ± 2.6). Mean cell number and apoptotic cell index, were similar for all treatment groups. **Conclusion:** L-carnitine supplementation during maturation, does not improve division rate and subsequent development of single cultured embryos, however increases cryotolerance post devitrification.

Key words: vitrification; in vitro embryo production; L-carnitine.

RESUMEN

Antecedentes: La L-carnitina es un potenciador del metabolismo lipídico y un potente antioxidante que previene el daño oxidativo y mejora la criotolerancia de los embriones bovinos. **Objetivo:** Determinar el efecto de la L-carnitina durante la maduración de ovocitos en la competencia de desarrollo y la criotolerancia de embriones bovinos cultivados individualmente. **Metodología:** Los embriones se produjeron in vitro utilizando complejos cumulo-ovocitos (CCOs) derivados de matadero. En el experimento 1, se utilizaron dos sistemas de cultivo individual en placas de 24 pozos y gotas de 20 µL de medio cubiertas de aceite mineral y placas de 96 pozos y gotas de 30 µL medio. En el experimento 2, los ovocitos fueron distribuidos al azar en dos grupos y madurados individualmente en placas de 96 pozos en un medio suplementado o no con 0.6mg/mL de L-carnitina. En el día 7 post fertilización, los blastocistos se vitrificaron sobre superficie sólida en pajuelas Fiberplug. Blastocistos no vitrificados fueron utilizados como control. La supervivencia embrionaria post desvitrificación se determinó mediante la reexpansión del blastocele y la tasa de eclosión a las 24 y 48 horas de cultivo post desvitrificación. El número total de células y la tasa de células apoptóticas mediante tinción TUNEL-DAPI se utilizaron como indicadores de calidad y criotolerancia. En ambos casos, las tasas de división y de blastocistos se evaluaron a las 48 horas y 7 días post fertilización, respectivamente. **Resultados:** No se encontraron diferencias significativas en el desarrollo embrionario entre los distintos sistemas de cultivo. No se observó ningún efecto de la suplementación

† Submitted March 15, 2023 – Accepted June 25, 2023. <http://doi.org/10.56369/tsaes.4832>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

ORCID = E. R. Lliteras-Martínez: <http://orcid.org/0005-8626-0886>; A. Palacios-Espinosa: <http://orcid.org/0000-0002-4726-4164>; J. L. Espinoza-Villavicencio: <http://orcid.org/0000-0001-8609-8325>; R. Ortega-Pérez: <http://orcid.org/0000-0002-3718-9439>; Peter E. J. Bols: <http://orcid.org/0009-0008-6835-9024>

con L-carnitina durante la maduración sobre el desarrollo embrionario, pero la supervivencia de los embriones aumentó ($P < 0.05$) a las 24 y 48 horas post desvitrificación. **Implicaciones:** El tratamiento con L-carnitina aumentó ($P < 0.05$) las tasas de reexpansión post desvitrificación (86.8 ± 3.0 frente a 70.0 ± 4.4) y fue similar al control no vitrificado (89.7 ± 2.6). No hubo diferencias significativas para el total de células y el índice de células apoptóticas entre los grupos. **Conclusión:** La suplementación con L-carnitina durante la maduración no mejora la tasa de división ni el desarrollo posterior de los embriones cultivados individualmente, aunque aumenta la criotolerancia tras la desvitrificación.

Palabras clave: vitrificación; producción in vitro de embriones; L-carnitina.

INTRODUCCIÓN

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son producidas normalmente durante la respiración mitocondrial en las blastómeras y son controladas por su complejo sistema endógeno de defensa antioxidante, que incluye enzimas antioxidantes endógenas como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y compuestos no enzimáticos como el glutatión, proteínas (ferritina, transferrina, ceruloplasmina e incluso albúmina) y depuradores de bajo peso molecular, como ácido úrico, coenzima Q y el ácido lipoico (Poljsak *et al.*, 2013). Condiciones inapropiadas de cultivo *in vitro* inducen la producción de excesivos niveles de ERO y la acumulación de lípidos en el citoplasma, lo cual está asociado a la obtención de embriones de menor calidad y baja criotolerancia (Zare *et al.*, 2021). Para compensar estas deficiencias y controlar las ERO, se utilizan antioxidantes y precursores de GSH que minimizan los efectos dañinos del estrés oxidativo y mejoran la capacidad de desarrollo y la criotolerancia de los embriones bovinos producidos *in vitro* (Ferré *et al.*, 2020).

El cultivo *in vitro* de embriones de mamíferos se basa en principios antiguos, sin embargo, no hay consenso en cuestiones básicas como la densidad, el tiempo, el cambio de medio, la atmósfera de gas y pequeños detalles técnicos, como la forma de preparación de las gotas (Vajta *et al.*, 2021). Los estudios sobre el metabolismo de ovocitos/embriones o el uso comercial de la punción *in vivo*, que tratan a donantes con bajos rendimientos de ovocitos, indican la necesidad de optimizar los protocolos de producción *in vitro* de embriones para cultivar ovocitos individualmente hasta la etapa de blastocisto. Según Goovaerts *et al.* (2011), las condiciones de cultivo para un solo ovocito generalmente perjudican su desarrollo, no obstante, recientes publicaciones han demostrado que el cultivo individual permite la selección de embriones con una alta competencia de desarrollo (Vajta *et al.*, 2021).

El interés por el papel de las carnitinas como moduladores mitocondriales para contrarrestar el desequilibrio energético y redox en ovocitos y embriones durante el cultivo *in vitro* y la criopreservación, es cada vez mayor (Placidi *et al.*, 2022; Kalehoei *et al.*, 2022). La L-carnitina tiene diversas funciones en el desarrollo de ovocitos y embriones en los primeros estadios de desarrollo, ya que favorece el metabolismo lipídico al controlar la transferencia de ácidos grasos a las mitocondrias

para la β oxidación y actúa como antioxidante para prevenir el daño oxidativo e inhibir la apoptosis, una señal en respuesta al estrés oxidativo (Li *et al.*, 2021).

Resultados publicados por Jiang *et al.* (2019) indican que, en condiciones *in vitro*, la L-carnitina puede prevenir el envejecimiento de los ovocitos bovinos y mejorar la capacidad de desarrollo embrionario. Los resultados de la suplementación con L-carnitina pueden variar según el perfil de lípidos celulares específico de la especie, el nivel de actividad mitocondrial o incluso la disponibilidad de lípidos en el medio de cultivo (Dubeibe *et al.*, 2020). Comúnmente, se utiliza para mejorar el rendimiento metabólico de ovocitos y embriones en sistemas de cultivo *in vitro* (Carrillo-González *et al.*, 2021) aunque se ha reportado su uso en las soluciones de vitrificación y desvitrificación de embriones ovinos producidos *in vivo* (Saraiva *et al.*, 2018).

Los efectos de la L-carnitina por adición a los medios en los embriones producidos in vitro sobre la calidad y criotolerancia son muy discutidos y contradictorios (Zolini *et al.* (2019); Carrillo-González *et al.* (2020); Li *et al.* (2021); El-Sokary *et al.* (2021)). No obstante, algunos autores refieren la eficacia de una concentración de 0.6 mg/mL de L-carnitina en el medio de MIV para aumentar el glutatión intracelular, la maduración nuclear y la tasa de división de embriones bovinos (Phongnimitr *et al.*, 2013) y de ratón (Zare *et al.*, 2015), así como su desarrollo hasta el estadio de blastocistos.

El objetivo de estos experimentos fue determinar el efecto de la L-carnitina durante la maduración de ovocitos en la competencia de desarrollo y la criotolerancia de embriones bovinos cultivados individualmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los productos químicos utilizados en este estudio fueron adquiridos de Sigma-Aldrich® (Bornem), Life-Technologies® y Roth-Fiers.

Recuperación de ovocitos

Los ovarios fueron recolectados en un matadero local y transportados inmediatamente al laboratorio en solución salina a 38 °C (NaCl 0.9 %) suplementada con kanamicina (1 %). Luego se lavaron 3 veces con solución salina tibia (38 °C) suplementada con kanamicina (1 %) y se aspiraron

todos los folículos con un diámetro entre 2-6 mm. Solo complejos cúmulo ovocitos (CCOs) con un cúmulo no expandido rodeados por cinco o más capas de células de cúmulo (categoría I) fueron seleccionados para la maduración *in vitro* (MIV).

Maduración de los ovocitos

Para la MIV se utilizó el medio TCM-199 (Life Technology, 31150-022) suplementado (0.4 mM de glutamina, 0.2 mM de piruvato de sodio, 50 µg/mL de gentamicina, 0.1 µM de cisteamina y 20 ng/mL de EGF). En el experimento 1, los CCOs se asignaron aleatoriamente a dos sistemas de cultivo en placas de 24 pozos a razón de un CCOs/gota de 20 µL de medio cubiertas de aceite mineral y placas de 96 pozos a razón de un CCOs/gota de 30 µL medio. Los CCOs del grupo control fueron madurados en grupos de 50 en 500 µL de medio en placas (Nunc®) de 4 pozos. En el experimento 2, los CCOs se distribuyeron al azar en dos grupos que fueron madurados individualmente en placas de 96 pozos sin L-carnitina (control) y suplementado con 0.6 mg/ml de L-carnitina (Sigma-Aldrich C0158). Para todos los grupos la MIV se desarrolló por 24 horas en atmósfera húmeda de 5 % CO₂ y 38.5 °C.

Fertilización *in vitro*

Para la fertilización se utilizó semen de un toro testado para la producción *in vitro* de embriones que fue descongelado y seleccionado por la técnica de doble gradiente de Percoll (90 % y 45 %). Los CCOs se coincubaron a una concentración de 1x10⁶ espermatozoide (sp)/ml en medio de fertilización que contenía 114 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 0.3 mM Na₂HPO₄, 2.1 mM CaCl₂·2H₂O, 0.4 mM MgCl₂·6H₂O, 25 mM HCO₃, 1 mM Piruvato, 36 mM Lactato, 2 µL/mL Rojo fenol, 6 mg/mL BSA, 50 µg/mL Gentamicina suplementado con 10 µL/mL de Heparina por 20 horas en atmósfera húmeda de 5% CO₂ y 38.5°C.

Cultivo *in vitro*

Después de la fertilización, se eliminaron las células del cúmulo por pipeteo o agitación con vortex para embriones cultivados individualmente (en cocultivo con células del cúmulo) o en grupos, respectivamente y los cigotos fueron cultivados en fluido oviductal sintético suplementado con Insulina-transferrina-selenio (10 µg/mL I; 5.5 µg/mL T; 6.7ng/mL S) y BSA; 2(w/v) % en atmósfera húmeda de 90 % N₂, 5 % O₂ y 5 % CO₂ a 38.5 °C. Se evaluó la competencia del desarrollo de los embriones a partir de la escisión (48 horas post fertilización) y la tasa de blastocistos (7 días post fertilización) y se definieron como el número de cigotos divididos o blastocistos formados por ovocitos madurados, respectivamente.

Vitrificación de embriones

A los 7 días post fertilización, los embriones en estadio de blastocisto y blastocisto expandido del Experimento 2, fueron vitrificados sobre superficie sólida en pajuelas Fiberplug utilizando una mezcla de Etilenglicol (15%), Dimetilsulfóxido (15%) y Sucrosa (0.5 M). La supervivencia embrionaria post desvitrificación se determinó mediante la reexpansión del blastocelo y la tasa de eclosión a las 24 y 48 horas de cultivo post desvitrificación. Los embriones fueron lavados en solución salina tamponada con fosfato (PBS -Ca,-Mg) y fijados en 4 % de Paraformaldehído. El número de células y el índice de células apoptóticas (número de células apoptóticas sobre el total de células contadas) se evaluaron mediante tinción con yoduro de propidio y TUNEL (en inglés:Terminal dUTP Nick End-Labeling), para detectar muerte celular asociada a la fragmentación del ADN (Vandaele *et al.*, 2006).

Análisis estadístico

Para comparar la tasa de división y blastocistos entre tratamientos, y la proporción de células apoptóticas, se utilizó un modelo de regresión logística binaria, comparando las probabilidades de división a través de los intervalos de predicción al 95% de dichas probabilidades para cada uno de los tratamientos (Minitab 19). Se utilizó un análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM (SAS, 1996) para el total de células por blastocisto, y pruebas de Tukey para las diferencias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según Vajta *et al.* (2021), la selección de embriones con la más alta competencia de desarrollo requiere un cultivo individual y la modificación del enfoque ampliamente utilizado "drop under oil". En nuestro estudio, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la tasa de división (66.8 ± 3.0 % vs 63.4 ± 3.0 %) y blastocistos (30.8 ± 3.5 % vs 27.7 ± 3.5 %) para el cultivo individual en placas de 24 o 96 pozos, respectivamente (Tabla 1). Se observó que el porcentaje de blastocistos fue significativamente superior ($P < 0.05$) para el cultivo en grupo (52.6 ± 2.2 %) respecto al cultivo individual en placas de 24 pozos (30.8 ± 3.5) y 96 pozos (27.7 ± 3.5 %). De manera similar, otros autores reportaron que el cultivo en grupo promueve el desarrollo de embriones bovinos a través de la secreción de factores paracrinos y autocrinos secretados al medio por los embriones (Fujita *et al.*, 2006) y que independientemente del sistema de cultivo individual que se utilice, este se encuentra asociado con una menor tasa de embriones respecto al cultivo en grupo (Doherty *et al.*, 1997).

Según Reed *et al.* (2011), los ovocitos de especies monoovulatorias, se fertilizan y desarrollan sin el efecto beneficioso de factores embriotróficos producidos por otros embriones, por lo que, en teoría,

Tabla 1. Efecto del tipo de cultivo individual en la tasa de división y blastocistos.

Parámetro	Grupo 1	Grupo 2	Control
Tasa de división (%)	66.8 ± 3.0 ^a	63.4 ± 3.0 ^a	76.3 ± 1.7 ^b
Blastocistos (%)	30.8 ± 3.5 ^a	27.7 ± 3.5 ^a	52.6 ± 2.2 ^b

Letras diferentes dentro de una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas para $P < 0.05$. Grupo 1, cultivo en placas de 24 pozos (un embrión/gota 20 μ L de medio cubiertas de aceite mineral); grupo 2, placas de 96 pozos (un embrión/gota de 30 μ L medio).

los embriones deben desarrollarse mejor cuando son cultivados individualmente. Otros autores (Herreros *et al.*, 2022) sugieren que el cultivo individual aumenta la tasa de formación de blastocistos y puede mejorar la calidad embrionaria.

De igual modo, estudios desarrollados en humanos por Marianowski *et al.* (2007) advirtieron una menor tasa de fertilización cuando los ovocitos fueron cultivados en grupos en un sistema abierto en placas de cuatro pozos (68 %) respecto a aquellos cultivados individualmente (78 %), probablemente debido a la exposición de ovocitos y espermatozoides a cambios ambientales como fluctuaciones de pH y temperatura. Según el propio autor, el cultivo individual en microgotas se caracteriza por una mayor tasa de fertilización debido a una distribución homogénea de espermatozoides en el medio de cultivo. Otros autores encontraron similar porcentaje de maduración (62.4 vs 67.7 %) y blastocistos (12.9 vs 15.2 %) para el cultivo individual y en grupos, respectivamente (Fukui *et al.*, 2000).

Así mismo, al evaluar el efecto de la adición de L-carnitina (0.6 mg/mL) en el medio de maduración sobre la tasa de división (77.6 ± 1.6 % vs 77.2 ± 1.6 %) y blastocistos (48.9 ± 2.2 % vs 47.7 ± 2.2 %) encontramos que no hubo diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0.05$). Estudios recientes, apoyan la hipótesis de que la L-carnitina no afecta significativamente la tasa de maduración y producción de embriones bovinos *in vitro* (Zolini *et al.*, 2019; Carrillo-González *et al.*, 2020).

Por el contrario, Zare *et al.* (2015) refieren que una concentración de L-carnitina de 0.6 mg/mL, aumenta significativamente el glutatión intracelular ($P < 0.001$) y la maduración nuclear en ovocitos de ratón ($P < 0.01$). La adición de 0.6 mg/mL de L-carnitina al medio de MIV aumentó significativamente la tasa de división ($P < 0.05$). La tasa de desarrollo de blastocistos en los grupos tratados fue significativamente mayor ($P < 0.001$) que en el grupo control. De la misma manera, Zare *et al.* (2017) observaron que ovocitos de ratón tratados con dichas concentraciones de L-carnitina, mostraron una mayor tasa de desarrollo hasta blastocistos en comparación con los ovocitos no tratados ($P < 0.01$).

Phongnimitr *et al.* (2013), reportaron una tasa de maduración de ovocitos bovinos significativamente mayor para los grupos suplementados con 0.3 y 0.6 mg/mL de L-carnitina en comparación con el control

($P < 0.05$). La tasa de formación de blastocistos en el grupo 0.6 mg/mL mejoró significativamente.

Resultados publicados por Xu *et al.* (2018) sugieren que la suplementación con acetil-L-carnitina durante la MIV de ovocitos de búfala, modifica la función mitocondrial, regula los factores paracrinos derivados de los ovocitos y aumenta la producción de hormonas esteroides, lo que conduce a una mayor calidad de los ovocitos maduros y un mejor desarrollo embrionario *in vitro*. Otros investigadores reportaron una disminución en la generación de ERO (41.6 %) y la cantidad de lípidos (8.1 %) mientras que la actividad mitocondrial aumentó (160 %) con respecto al control, y mejoró la cinética y el porcentaje de blastocistos a partir de ovocitos bovinos madurados con L-carnitina (Jaramillo *et al.*, 2019).

Khanmohammadi *et al.* (2016), informaron el incremento del porcentaje de blastocistos ($P < 0.01$) y el número total de células de embriones de ratón debido al efecto antioxidante de la L-carnitina a una concentración de 0.5 mg/mL. Otros autores, refieren que la L-carnitina durante la MIV, reduce la toxicidad del embrión inducida por el estrés oxidativo al disminuir las ERO y aumentar el GSH intracelular en ovocitos ovinos (Mishra *et al.*, 2016) y aumenta la tasa de división y el porcentaje de embriones de búfalo (El-Sokary *et al.*, 2021).

De la misma manera, otros autores demostraron que la suplementación con L-carnitina a un nivel de 0.5 mg/mL durante la MIV mejoró el potencial de desarrollo de los ovocitos de camello expresado en un aumento de la tasa de división y desarrollo embrionario respecto al grupo control (Fathi y El-Shahat, 2017), reduce el contenido de lípidos de embriones bovinos de la raza Jersey y Holstein debido al aumento de la actividad mitocondrial (Baldoceda *et al.*, 2016) y mejora las tasas de maduración, fertilización y desarrollo de embriones caninos cuando se utiliza a razón de 0.6 mg/mL (Moawad *et al.*, 2021).

La falta de consenso entre los resultados encontrados con ovocitos en diferentes especies puede estar determinada por la calidad de los ovocitos utilizados. Según Knitlova *et al.* (2017), la L-carnitina (2.5 mM) mejoró la tasa de producción de embriones bovinos a partir de ovocitos meióticamente menos competentes (33.3 %) en comparación con el grupo control (25.83 %). Sin embargo, los ovocitos derivados de folículos medianos (6-10 mm) y

Tabla 2. Criotolerancia post desvitrificación de embriones bovinos madurados individualmente en un medio suplementado con 0.6 mg/mL de L-carnitina.

Parámetro	Con L-carnitina	Sin L-carnitina	Control no vitrificado
Reexpansión (24 h)	86.0 ± 2.8 ^b	71.9 ± 3.6 ^c	95.1 ± 1.8 ^a
Reexpansión (48 h)	86.0 ± 2.8 ^b	71.9 ± 3.6 ^c	95.1 ± 1.8 ^a
Tasa de eclosión	86.8 ± 3.0 ^a	70.0 ± 4.4 ^b	89.7 ± 2.6 ^a

Letras diferentes dentro de una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas para $P < 0.05$.

clasificados como meióticamente más competentes, no mostraron diferencia. En nuestro estudio, los criterios de inclusión al diámetro del folículo fueron de 2 a 6 mm, sin embargo, no encontramos diferencias entre tratamientos, utilizando 0.6 mg/mL de L-carnitina durante el proceso de MIV.

A partir de nuestros resultados (Tabla 2), se observó un aumento de la tasa de supervivencia ($P < 0.05$) a las 24 y 48 horas ($86.0 \pm 2.8\%$ vs $71.9 \pm 3.6\%$) post desvitrificación de los embriones obtenidos a partir de ovocitos madurados en presencia de L-carnitina respecto al control, pero fue inferior al grupo testigo no vitrificado ($95.1 \pm 1.8\%$). La tasa de reexpansión en el grupo tratado con L-carnitina, mejoró significativamente ($P < 0.05$) posterior a la desvitrificación ($86.8 \pm 3.0\%$ vs $70.0 \pm 4.4\%$) y fue similar al control no vitrificado ($89.7 \pm 2.6\%$).

Los resultados de nuestra investigación demuestran que la suplementación del medio de maduración de ovocitos bovinos con L-carnitina, aumenta la criotolerancia embrionaria. Resultados similares fueron publicados por Takahashi *et al.* (2013), quienes refieren que la L-carnitina, aumentó el metabolismo de los lípidos en los embriones bovinos, lo que resultó en un mejor desarrollo y criotolerancia. Según Phongnimitr *et al.* (2013), la suplementación de L-carnitina durante la MIV de ovocitos bovinos mejoró su maduración nuclear y posterior desarrollo embrionario después de la fertilización, pero cuando se vitrificaron, los efectos mejoradores se neutralizaron.

Lowe *et al.* (2017), reportaron un aumento en la tasa de supervivencia posterior a la desvitrificación de los blastocistos derivados de ovocitos porcinos tratados con L-carnitina respecto al grupo control no tratado (42.4% vs 24.9%). De la misma manera, la adición de L-carnitina a una concentración de 0.5 mM al medio de MIV, mejora el desarrollo del ovocito, la competencia y criotolerancia de embriones de búfalo posterior a la desvitrificación, pero no después de 24 h de cultivo. (El-Sokary *et al.*, 2021).

Según (Carrillo-González *et al.*, 2020), no se encontraron diferencias significativas para la tasa de supervivencia después de la vitrificación y desvitrificación de embriones a partir de ovocitos bovinos cultivados en un medio suplementado con L-carnitina.

Zolini *et al.* (2019) indicaron que no hubo efecto de la suplementación del medio de maduración con L-

carnitina en el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos, pero los embriones tratados, mostraron un aumento ($P \leq 0,05$) de las tasas de reexpansión posteriores a la descongelación, independientemente de la concentración (0.75, 1.5 y 3.03 mM).

No hubo diferencia significativa en el número de células por blastocisto (103.2 ± 4.68 ; 122.5 ± 5.26 ; 118.5 ± 3.28) y el índice de células apoptóticas (2.95 ± 0.53 ; 3.02 ± 0.50 ; 3.04 ± 1.35) para el grupo suplementado con L-carnitina, no suplementado y control no vitrificado, respectivamente). De igual manera, trabajos publicados por Takahashi *et al.* (2013), no reportaron diferencias para la tasa de células apoptóticas entre blastocistos bovinos tratados y control. Según Zare *et al.* (2015), la adición de L-carnitina al medio de MIV, no tuvo un efecto significativo sobre el número total de células por blastocisto. En cambio, Khanmohammadi *et al.* (2016), informaron el incremento del número total de células en embriones de ratón debido al efecto antioxidante de la L-carnitina a una concentración de 0.5 mg/mL.

CONCLUSIÓN

La suplementación de L-carnitina durante la maduración de los ovocitos bovinos no mejora la tasa de división y posterior desarrollo de embriones cultivados individualmente, sin embargo, aumenta la criotolerancia posterior a la desvitrificación.

Funding. There was no external funding for this work.

Conflict of interest. The authors declare that they have not conflict of interest.

Compliance with ethical standards. No permits by Institutional Animal Care and Use Committee were required for the study, as ovaries were collected using a standard procedure and no other tissue was collected (i.e., blood).

Data availability. The data is available with the corresponding author (palacios@uabc.mx) upon request.

Author contribution statement (CRediT). **E.R. Lliteras-Martínez.** Conceptualization, Investigation, writing, - original draft, **A. Palacios-Espinosa** Methodology, Investigation, Formal Analysis, **J.L. Espinoza-Villavicencio.** Methodology, Investigation, Formal Analysis, **R.**

Ortega-Pérez, writing - original draft, writing - review and editing. **Peter E. J. Bols**, writing- review and editing.

REFERENCIAS

- Baldoceda, L., Gagné, D., Ferreira, C.R. and Robert, C., 2016. Genetic influence on the reduction in bovine embryo lipid content by L-carnitine. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(8), pp. 1172-1184. <https://doi.org/10.1071/rd14215>
- Carrillo-González, D.F., Hernández-Herrera, D.Y., Maldonado-Estrada, J.G., 2021. The role of L-carnitine in bovine embryo metabolism. A review of the effect of supplementation with a metabolic modulator on *in vitro* embryo production. *Animal Biotechnology*, 34(2), pp. 413-423. <https://doi.org/10.1080/10495398.2021.1938593>
- Carrillo-González, D. F., Rodríguez-Osorio, N., Long, C. R., Vásquez-Araque, N. A. and Maldonado-Estrada, J. G., 2020. L-Carnitine supplementation during *in vitro* maturation and *in vitro* culture does not affect the survival rates after vitrification and warming but alters Inf-T and ptgs2 gene expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), pp. 1-15. <https://doi.org/10.3390/ijms21165601>
- Doherty, E.M.O., Wade, M.G., Hill, J. L. and Boland, M.P. 1997. Effects of culturing bovine oocytes either singly or in groups on development to blastocysts. *Theriogenology*, 48(1), pp. 161–169. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(97\)00199-4](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(97)00199-4)
- Dubeibe-Marin, D.F., Nogueira da Costa, N., di Paula Bessa Santana, P., Baia de Souza, E., Rolim filho, S.T., da Silva Cordeiro, M., and Ohashi, O.M., 2020. Influence of L-carnitine on lipid metabolism of buffalo cumulus-oocyte complexes matured in either fetal bovine serum or fatty acid-free bovine serum albumin. *Theriogenology*, 158, pp. 382–390. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.09.030>
- El-Sokary, M. M. M., El-Naby, A.S., Al-H. H., El Hameed, A.R.A., Mahmoud, K.Gh.M. and Scholkamy, T.H., 2021. Impact of L-carnitine supplementation on the *in vitro* developmental competence and cryotolerance of buffalo embryos. *Veterinary World*, 14(12), pp. 3164–3169. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.3164-3169>
- Fathi, M. and El-Shahat, K.H., 2017. L-carnitine enhances oocyte maturation and improves *in vitro* development of embryos in dromedary camels (*Camelus dromedaries*). *Theriogenology*, 104, pp. 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.08.006>
- Ferré, L.B., Kjelland, M.E., Taiyeb, A.M., Campos-Chillon, F. and Ross, P.J., 2020. Recent progress in bovine *in vitro*-derived embryo cryotolerance: Impact of *in vitro* culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(6), pp. 659–676. <https://doi.org/10.1111/rda.13667>
- Fujita, T., Umeki, H., Shimura, H., Kugumiya, K. and Shiga, K., 2006. Effect of Group Culture and Embryo-culture Conditioned Medium on Development of Bovine Embryos. *Journal of Reproduction and Development*, 52(1), pp. 137–142. <https://doi.org/10.1262/jrd.16084>
- Fukui, Y., Kikuchi, Y., Kondo, H. and Mizushima, S., 2000. Fertilizability and developmental capacity of individually cultured bovine oocytes. *Theriogenology*, 53(8), pp. 1553–1565. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(00\)00297-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(00)00297-1)
- Goovaerts, I.G.F., Leroy, J.L.M.R., Rizos, D., Bermejo-Alvarez, P., Gutierrez-Adan, A., Jorssen, E.P.A. and Bols, P.E.J., 2011. Single *in vitro* bovine embryo production: coculture with autologous cumulus cells, developmental competence, embryo quality and gene expression profiles. *Theriogenology*, 76(7), pp. 1293–1303. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.036>
- Herreros, M., Martí, L., Díaz, N., Tió, M.C., Rodríguez-Arnedo, A., Guerrero, J., Ortiz, J., Ten, J. and Bernabeu, R., 2022. O063 Impact of group embryo culture vs individual embryo culture strategies on blastocyst rate and quality. *Human Reproduction*, 37(Supplement_1). <https://doi.org/10.1093/humrep/deac104.077>
- Jaramillo-Bolívar, N., Arzuaga-Cedeño, J. M., Giraldo-Giraldo, J. J. and Vásquez-Araque, N.A., 2019. Parámetros metabólicos, antioxidantes y competencia para el desarrollo embrionario de ovocitos bovinos madurados *in vitro* con L-Carnitina. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 30(1), pp. 265–275. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i1.15703>

- Jiang, W.J., Yao, X.R., Zhao, Y.H., Gao, Q.S., Jin, Q.G., LI, Y.H., Yan, ang-Guo, and Xu, Y.N., 2019. L-carnitine prevents bovine oocyte aging and promotes subsequent embryonic development. *Journal of Reproduction and Development*, 65(6), pp. 499–506. <https://doi.org/10.1262/jrd.2019-046>
- Kalehoei, E., Moradi, M., Azadbakht, M., Zhaleh, H., Parvini, M., Cheraghbaeigi, S. and Saghari, S., 2022. In vitro maturation medium supplementation: utilization of repaglinide, L-carnitine, and mesenchymal stem cell-conditioned medium to improve developmental competence of oocytes derived from endometriosis mouse models. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 55, pp. 1-11. <https://doi.org/10.1590/1414-431x2022e11948>
- Khanmohammadi, N., Movahedin, M., Safari, M., Sameni, H. R., Yousefi, B., Jafari, B. and ZARBAKHSH, S., 2016. Effect of L-carnitine on in vitro developmental rate, the zona pellucida and hatching of blastocysts and their cell numbers in mouse embryos. *International Journal of Reproductive Biomedicine*, 14(10), pp. 649–656. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27921089/>
- Knitlova, D., Hulinska, P., Jeseta, M., Hanzalova, K., Kempisty, B. and Machatkova, M., 2017. Supplementation of l-carnitine during in vitro maturation improves embryo development from less competent bovine oocytes. *Theriogenology*, 102, pp. 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.06.025>
- Li, J., Liu, L., Weng, J., Yin, T., Yang, J. and Feng, H.L., 2021. Biological roles of l -carnitine in oocyte and early embryo development. *Molecular Reproduction and Development*, 88(10), pp. 673–685. <https://doi.org/10.1002/mrd.23542>
- Lowe, J.L., Bartolac, L.K., Bathgate, R. and Grupen, C.G., 2017. Supplementation of culture medium with L-carnitine improves the development and cryotolerance of in vitro-produced porcine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(12), pp. 2357. <https://doi.org/10.1071/rd16442>
- Marianowski, P., Szymusik, I., Grzechocinska, B. and Cyganek, A., 2007. The comparison of two different embryo culture methods in the course of in vitro fertilization program. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 45 Suppl 1(Suppl 1), pp. 115-117. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18292847/>
- Mishra, A., Reddy, I., Gupta, P. and Mondal, S., 2016. l-carnitine Mediated Reduction in Oxidative Stress and Alteration in Transcript Level of Antioxidant Enzymes in Sheep Embryos Produced *In Vitro*. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(2), pp. 311–321. <https://doi.org/10.1111/rda.12682>
- Moawad, A.R., Salama, A., Badr, M.R. and Fathi, M., 2021. Beneficial Effects of L-Carnitine Supplementation during IVM of Canine Oocytes on Their Nuclear Maturation and Development In Vitro. *Animals*, 11(2), pp. 581. <https://doi.org/10.3390/ani11020581>
- Phongnimitr, T., Liang, Y., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Treetampinich, C. and Parnpai, R., 2013. Effect of L-carnitine on maturation, cryo-tolerance and embryo developmental competence of bovine oocytes. *Animal Science Journal*, 84(11), pp. 719–725. <https://doi.org/10.1111/asj.12067>
- Placidi, M., Di Emidio, G., Virmani, A., D'Alfonso, A., Artini, P.G., D'Alessandro, A.M. and Tatone, C., 2022. Carnitines as Mitochondrial Modulators of Oocyte and Embryo Bioenergetics. *Antioxidants*, 11(4), pp. 745. <https://doi.org/10.3390/antiox11040745>
- Poljsak, B., Šuput, D. and Milisav, I., 2013. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, pp. 1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/956792>
- Reed, M.L., Woodward, B.J. and Swain, J.E., 2011. Single or Group Culture of Mammalian Embryos: The Verdict of the Literature. *Journal of Reproductive and Stem Cell Biotechnology*, 2(2), pp. 77–87. <https://doi.org/10.1177/205891581100200203>
- Saraiva, H.F.R.A., Batista, R.I.T.P., Alfradique, V.A.P., Pinto, P.H.N., Ribeiro, L.S., Oliveira, C.S., Souza-Fabjan, J.M.G., Camargo, L.S.A., Fonseca, J.F. and Brandão, F.Z., 2018. l -carnitine supplementation during vitrification or warming of in vivo -produced ovine embryos does not affect embryonic survival rates, but alters CrAT and PRDX1 expression. *Theriogenology*, 105, pp. 150–

- 157
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.022>
- SAS (1996). User's guide. Statistics. Inst Inc.
- Takahashi, T., Inaba, Y., Somfai, T., Kaneda, M., Geshi, M., Nagai, T. and Manabe, N., 2013. Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 25(4), pp. 589
<https://doi.org/10.1071/rd11262>
- Vajta, G., Parmegiani, L., Machaty, Z., Chen, W. B. and Yakovenko, S., 2021. Back to the future: optimized microwell culture of individual human preimplantation stage embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(10), pp. 2563–2574.
<https://doi.org/10.1007/s10815-021-02167-4>
- Vandaele, L., Mateusen, B., Maes, D., de Kruif, A. and Van Soom, A., 2006. Is apoptosis in bovine in vitro produced embryos related to early developmental kinetics and in vivo bull fertility? *Theriogenology*, 65(9), pp. 1691–1703.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.014>
- Xu, H.Y., Yang, X.G., Lu, S.S., Liang, X.W., Lu, Y.Q., Zhang, M. and Lu, K.H., 2018. Treatment with acetyl-l-carnitine during in vitro maturation of buffalo oocytes improves oocyte quality and subsequent embryonic development. *Theriogenology*, 118, pp. 80–89.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.05.033>
- Zare, Z., Abouhamzeh, B., Masteri Farahani, R., Salehi, M. and Mohammadi, M., 2017. Supplementation of L-carnitine during in vitro maturation of mouse oocytes affects expression of genes involved in oocyte and embryo competence: An experimental study. *International Journal of Reproductive Biomedicine*, 15(12), pp. 779–786.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29492475/>
- Zare, Z., Masteri Farahani, R., Salehi, M., Piryaei, A., Ghaffari Novin, M., Fadaei Fathabadi, F., Mohammadi, M. and Dehghani-Mohammadabadi, M., 2015. Effect of L-carnitine supplementation on maturation and early embryo development of immature mouse oocytes selected by brilliant cresyle blue staining. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(4), pp. 635–643. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0430-5>
- Zare, Z., Rezaei, N. and Mohammadi, M., 2021. Treatment of mouse cumulus-oocyte complexes with L-carnitine during vitrification and in vitro maturation affects maturation and embryonic developmental rate after parthenogenetic activation. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 51(1), pp. 44–50.
<https://doi.org/10.1111/ahe.12750>
- Zolini, A. M., Carrascal-Triana, E., Ruiz de King, A., Hansen, P. J., Alves Torres, C. A. and Block, J., 2019. Effect of addition of l-carnitine to media for oocyte maturation and embryo culture on development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*, 133, pp. 135–143.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.005>