N.º Referencia: AGL2007-60227

MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN
Y GESTIÓN DEL PLAN NACIONAL DE I+D+i

PROYECTOS I+D+i, ACCIONES ESTRATÉGICAS Y ERANET

INFORME FINAL

Investigador Principal:	**Maria Teresa Paramio Nieto**
Título de la actuación:	ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD Y CANTIDAD DE OVOCITOS OBTENIDOS PARA LA APLICACION COMERCIAL DE LAS TECNOLOGIAS EMBRIONARIAS EN EL GANADO BOVINO Y CAPRINO
Organismo:	**Universitat Autónoma de Barcelona**
Centro	Veterinaria
Departamento	Ciencia Animal i dels Aliments
Fecha de inicio	**1 diciembre 2007**
Fecha de finalización	**30 noviembre 2010**

Sr. Subdirector General de Proyectos de Investigación
Este documento no debe remitirse en papel/ por correo postal a la Subdirección

A. MEMORIA. Resumen de las actividades realizadas y de los resultados del proyecto en relación con los objetivos propuestos (máximo 2.000 palabras).
Destaque su relevancia científica y/o su interés tecnológico.
En el caso de haber obtenido resultados no previstos inicialmente, indique su relevancia para el proyecto.
En caso de resultados fallidos, indíquense las causas.

El proyecto AGL2007-60227 tenía por hipótesis de trabajo y objetivos a estudiar los siguientes: Nuestra hipótesis a evaluar es que la calidad de los ovocitos es el parámetro principal que afecta al desarrollo embrionario. Además, la calidad del ovocito también afectará a la resistencia de éste a los procesos de críoconservación ovocitaria y de biopsia embrionaria para el sexaje. Tecnologías todas ellas de gran impacto en los programas reproductivos. Así, los objetivos específicos de este proyecto son, utilizando ovocitos: a) pequeños y sometidos a un medio de crecimiento previo a la maduración in vitro b) ovocitos convencionalmente seleccionados: mayores de 125 µm en cabras y recogidos de folículos mayores de 3 mm en vacuno y c) ovocitos recuperados de hembras vivas mediante OPU.

Objetivo 1: Estudio del medio de crecimiento previo a la MIV sobre el desarrollo embrionario de ovocitos pequeños.

Una de las principales limitaciones de la Producción in vitro de embriones (PIVE) con ovocitos de hembras prepúberes era que su bajo rendimiento en desarrollo a blastocistos era debido en parte el elevado número de ovocitos que no habían finalizado su crecimiento y por lo tanto eran incompetentes para llegar al estadio de blastocisto. Según un estudio de Wu et al (2007) en porcino, los ovocitos de pequeño diámetro sometidos a un cultivo de "crecimiento" previo a la Maduración in vitro (MIV) podían desarrollarse hasta blastocistos en el mismo porcentaje que los ovocitos procedentes de folículos mas grandes o de ovocitos de mayor diámetro. Este medio de crecimiento se basaba fundamentalmente en añadir al medio de cultivo convencional Insulina Transferina y Selenio. Sobre esta base y combinando distintas concentraciones y distintos tiempos de cultivo hemos realizado estudios con ovocitos de hembras prepúberes en vacuno, caprino y ovino. Los resultados están reflejados en las publicaciones obtenidas. En general se ha podido concluir en todas las especies que los ovocitos pequeños premadurados en un medio de crecimiento antes de la MIV han alcanzado e incluso incrementado el porcentaje de blastocistos respecto a los ovocitos control. Sin embargo el porcentaje de blastocistos sigue siendo menor que los ovocitos de hembras adultas (en vacuno), los ovocitos seleccionados por BCB (ovino) y/o que los ovocitos de mayor diámetro (caprino).

Objetivo 2 Puesta a punto de la técnica FISH en embriones de caprino para su utilización en sexaje y anomalías cromosómicas de los embriones producidos in vitro:

Con este estudio pretendíamos en primer lugar poner a punto esta técnica de pintado de cromosomas (Fluorescence In Situ Hybridation) para poder conocer el sexo de los embriones y en segundo lugar para detectar las anomalías en el número de cromosomas que teníamos en los blastocistos producidos in vitro de ovocitos de cabras prepúberes. Estudiábamos si estas anomalías podían estar afectadas por el tamaño del folículo del que provenían los ovocitos. En el mercado no existían sondas para marcar los cromosomas caprinos y tuvimos que poner a punto las sondas de ovino para el marcaje de los cromosomas caprinos: X, Y y el numero 10.
Las conclusiones de este estudio es que la FISH en caprino podía realizarse con las sondas del ovino. En segundo lugar que el porcentaje de embriones XY era mayor que el porcentaje de embriones hembra, aunque no altamente significativo. La mayor parte de los blastocistos estudiados presentaban algunas blastomeras con haploidia anormal, aunque según la bibliografía este porcentaje no les hacía inviables. En último, no hubo diferencias en cuanto a anomalías cromosómicas entre blastocistos procedentes de ovocitos de folículos mayores de 3 mm y menores, a pesar que el porcentaje de blastocistos obtenidos de los folículos mayores fue significativamente superior. Los resultados procedentes de estos experimentos dieron lugar al trabajo de investigación del DEA de la estudiante Aida Casanovas y fueron parte de los resultados del trabajo de tesis doctoral de Roser Romaguera. Estos resultados fueron publicados en las revistas científicas citadas debajo.

Objetivo 3. Utilización de la LOPU en cabras como sistema para disponer de una mayor variedad de folículos en distintos estado de crecimiento.

Durante muchos años en nuestro laboratorio se han realizado estudios sobre la calidad de los ovocitos de cabras prepúberes para la producción de embriones in vitro. La característica de estos ovarios es presentar un número elevado de folículos antrales pequeños. En trabajos previos habíamos observado que los ovocitos procedentes de folículos mayores de 2 mm eran capaces de reiniciar y finalizar la meiosis in vitro pero que solo un reducido número de ellos eran capaces de desarrollarse hasta el estadio de blastocisto después de ser fecundados y cultivados in vitro (FIV-CIV). Con estos resultados éramos incapaces de determinar si el bajo rendimiento en blastocistos

(alrededor del 10%) era debido a la edad de las cabras donantes de ovocitos (entre 30 y 45 días de vida) o era debido a que los folículos de donde obteníamos los ovocitos eran muy pequeños. Con el objetivo de resolver este tema debíamos poner a punto en nuestro laboratorio un sistema que nos permitiera obtener ovocitos de hembras adultas y de distinto tamaño folicular. Para ello y en colaboración con profesores de cirugía de nuestra facultad pusimos a punto la técnica de recogida de ovocitos mediante laparoscopia (LOPU) estudiando los rendimientos y los tipos de ovocitos obtenidos.
Los resultados obtenidos de este estudio fueron parte de la tesis de la Sra Roser Romaguera. Comparando los blastocistos obtenidos de prepúberes y adultas según su diámetro folicular llegamos a la conclusión que el diámetro del folículo es más determinante en la competencia del ovocitos para producir blastocistos que la edad de la hembra. Los resultados de estos estudios están publicados en las referencias que se indican abajo.

Objetivo 4. Estudios sobre congelación de embriones producidos in vitro en hembras adultas y pre púberes.

El objetivo de este estudio era primero poner a punto metodologías de crioconservación que permitieran mayor viabilidad a los blastocistos obtenidos in vitro después de la descongelación. El segundo objetivo era poder determinar la calidad de los embriones producidos según el tipo de ovocito utilizado (adulta vs prepuber; distintos tamaños foliculares) en relación a la resistencia a la crioconservación. Los principales resultados de este estudio demostraron que los ovocitos de cabras prepúberes independientemente del tamaño folicular del cual procedían los ovocitos no mostraban diferencias en su resistencia a la crioconservación. Estos resultados fueron parte de la tesis de la Sra Roser Romaguera y están publicados en las revistas referenciadas abajo. Paralelamente se realizó el estudio del efecto del grado de desarrollo de los blastocistos en el momento de la vitrificación. Además, se comparó el efecto de la edad de los animales (prepúberes vs adultas) con la viabilidad de los embriones postvitrificación. Los resultados de este estudio han dado lugar a dos publicaciones referenciadas en el apartado correspondiente a publicaciones.

B. RESULTADOS MÁS RELEVANTES ALCANZADOS EN EL PROYECTO (máximo 60 palabras). Indicar únicamente los relacionados con el proyecto.

Dentro de los logros del proyecto señalados en el apartado anterior, reseñe los más relevantes hasta un máximo de tres.

Los resultados más relevantes científicamente de este proyecto han sido:

1. Se ha puesto a punto por primera vez la FISH en blastómeros de embriones de cabra utilizando las sondas de ovino.
2. Se ha puesto a punto la técnica de *laparoscopic ovuim pick-up (*LOPU) con éxito en cabras tanto prepúberes como en adultas con la finalidad de llevar a cabo los experimentos del grupo.
3. La competencia de los ovocitos para producir blastocistos *in vitro* estás más determinado por el tamaño de su folículo que por la edad de la cabra. La calidad de los blastocistos no depende del tipo de ovocito.
4. La capacidad de desarrollo de los ovocitos madurados *in vitro* de hembras prepúberes mejoró cuando los ovocitos fueron madurados en presencia del complejo insulina-transferrina-selenio (ITS) y el ácido L-ascórbico (ASC) por tan sólo las primeras 12 h. Por lo tanto, la adición de factores de crecimiento y antioxidantes como el ITS y ASC mejora la maduración citoplasmática y el desarrollo embrionario de los ovocitos bovinos prepúberes.
5. La supervivencia después de la vitrificación de blastocistos PIV aumenta progresivamente a medida que la etapa de desarrollo avanza. Entre los blastocistos producidos *in vitro*, los vitrificados en el estadio de blastocisto expandido y/o eclosionado mostraron la mayor tasa de supervivencia después del calentamiento.

C. RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO. Indicar únicamente los relacionados con el proyecto.

Nota: Adjuntar en formato digital la primera página y aquella en la que se mencione a las entidades financiadoras del proyecto, de una selección de las 5-10 publicaciones que se consideren más relevantes.

C1. Formación del personal	N.º				
Personal formado	(7)				
Personal formado o en formación que se ha transferido al sector industrial:					
Doctores (1)	Titulados Superiores	(6)	Técnicos	( )	
C2. Tesis doctorales	(1)				
C3. Artículos científicos en revistas	( )	nacionales	(6)	internacionales	
C4. Artículos de divulgación en revistas	(1)	nacionales	( )	internacionales	
C5. Artículos de revisión en revistas	(1)	nacionales	(1)	internacionales	
C6. Libros, capítulos de libros y monografías	(2)	nacionales	( )	internacionales	
C7. Conferencias en congresos (por invitación)	( )	nacionales	(3)	internacionales	
C8. Patentes y otros títulos de propiedad industrial	( )	registrados	( )	en explotación	
	( )	España	( )	extranjero	

C1. FORMACIÓN DE PERSONAL EN EL PROYECTO, (becarios, técnicos de apoyo, doctorandos…) describir brevemente.

Aída Casanovas: Máster en Septiembre 2008.

Montserrat Roura: Técnica de apoyo y Máster en Julio 2010.

Roser Romaguera: Becaria FI0033-AGAUR. 2006-2009. Doctorada en Julio 2010.

María Catalá: Becaria FI-AGAUR. 2007-2010. Defensa prevista de la tesis doctoral Junio 2011.

Sondes Hammami: Becaria AECI. 2009-2012. Inicio de la tesis doctoral en Septiembre 2009.

Bladimir Córdova: Becario FI-AGAUR. 2007-2010. Defensa prevista de la tesis doctoral Junio 2011.

Dra. Roser Morató: Investigadora postdoctoral I3. MEC. 2009-2011.

Dra. Maria Teresa Paramio. Catedrática Universidad.

Dra. Dolors Izquierdo Tugas. Profesora Contratada Universidad.

Dra. Teresa Mogas Amorós. Profesora Titular Universidad.

C2. TESIS DOCTORALES REALIZADAS TOTAL O PARCIALMENTE EN EL PROYECTO
Indicar: título, nombre del doctorado, Universidad, Facultad o Escuela, fecha de comienzo, fecha de lectura, calificación y director.

Tipo de tesis: Tesis doctoral
Titulo: Efecto del tamaño folicular sobre el desarrollo y la calidad de los embriones caprinos producidos in vitro
Doctorando: Roser Romaguera i Matas
Universidad: UAB
Facultad: Veterinaria

Fecha: 19 de Julio 2010
Director: Maria Teresa Paramio y Dolors Izquierdo

Tipo de tesis: Tesis doctoral
Titulo: Producción in vitro de embriones ovinos: estudio de la calidad del ovocito de corderas
Doctorando: Maria Gracia Catalá
Universidad: UAB
Facultad: Veterinaria
Fecha: Prevista Junio 2011
Director: Maria Teresa Paramio

Tipo de tesis: Tesis doctoral
Titulo: Estudio de los factores secretados por el ovocito.
Doctorando: Sondes Hammami
Universidad: UAB
Facultad: Veterinaria
Fecha: Prevista Junio 2013
Director: Dolors Izquierdo

Tipo de tesis: Tesis doctoral
Titulo: Efecto del medio de maduración in vitro sobre la calidad y expresión génica de los ovocitos bovinos.
Doctorando: Bladimir Córdova
Universidad: UAB
Facultad: Veterinaria
Fecha: Prevista Junio 2011
Director: Teresa Mogas

C3. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS EN REVISTAS
Indicar: autor(es), título, referencia de la publicación.

Morató R, Romaguera R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. Stage-dependent viability of vitrified goat blastocysts. Cryobiology. 2011 (submitted)

Romaguera R, Moll X., Morató R, Jiménez-Macedo AR, Catalá M, Roura M,Izquierdo D, Mogas T., Paramio MT. Prepubertal goat oocytes from large follicles result in similar blastocyst production and embryo ploidy than those from adult goats. Theriogenology. 2011 (corrected proof on line).

Romaguera R, Morató R, Jiménez-Macedo AR, Catalá M, Roura M, Paramio MT, et al. Oocyte secreted factors improve embryo developmental competence of cocs from small follicles in prepubertal goats. Theriogenology. 2010; 74(6):1050-9.

Córdova BL, Morató R, Izquierdo MD, Ballester J, Paramio MT, Mogas T. Effect of insulin, transferrin, selenium and ascorbic acid in meiotic competence and embryo development of prepubertal bovine oocytes. Theriogenology. 2010; 74 (8): 1341- 1348.

Morató R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of in vitro-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. Reproduction, Fertility and Development. 2010; 22(7):1141-7.

Romaguera R, Casanovas A, Morató R, Izquierdo D, Catalá M, Jimenez-Macedo AR, et al. Effect of follicle diameter on oocyte apoptosis, embryo development and chromosomal ploidy in prepubertal goats. Theriogenology. 2010; 74(3):364-73.

Anguita, B.; Paramio, T.; Morató, R.; Romaguera, R.; Jimenez-Macedo, A.R.; Mogas, T.; Izquierdo, D. Effect of the apoptosis rate observed in oocytes and cumulus cells on embryo development in prepubertal goats. *Animal Reproduction Science. 2009; 116: 95-106.*

Romaguera R, Catala MG, Morato R, Casanovas A, Mogas T, Izquierdo D, Paramio MT. Effect of nuclear stage on the incidence of apoptosis in prepubertal goat oocytes. *Reproduction in Domestic Animals. 2008; 43: 65 (Abstract).*

Morató R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. Structural analisys of in vitro matured bovine oocytes vitrified in cryotops. *Reproduction in Domestic Animals. 2008; 43: 54 (Abstract).*

Casanova A, Vidal F, Romaguera R, Morató R, Catalá M, Izquierdo D, Mogas T, Paramio MT. Sexing of goat blastocysts produced *in vitro* by fish using chromosome x and y ovine specific probes. *Reproduction, Fertility and Development, Vol. 22 No. 1 Pages 339 - 340, Published 8 December 2009 (Abstract).*

Romaguera R, *Jiménez-macedo AR*, *Izquierdo D*, *Morató R*, *Català M*, *Roura M*, *Palomo MJ*, *Paramio MT.* Effect of oocyte-secreted factors (osf) on embryo development of oocytes from small follicles of prepubertal goats. *Reproduction, Fertility and Development, Vol. 22 No. 1 Pages 333 - 334, Published 8 December 2009 (Abstract).*

Catalá MG, *Izquierdo D*, *Romaguera R*, *Roura M*, *Paramio MT.* Effect Of A Growth Medium During IVM On Embryo Development Of Prepubertal Ewe Oocytes. *Reproduction, Fertility and Development, Vol. 22 No. 1 Pages 323 - 324, Published 8 December 2009 (Abstract).*

Hammami S, *Romaguera R*, *Roura M*, *Catalá MG*, *Morató R*, *Mogas T*, *Paramio MT*, *Izquierdo D*. *In vitro* developmental competence of prepubertal goat oocytes cultured in growth medium. *Reproduction, Fertility and Development, Vol. 23 No. 1 Pages 228 - 228, Published 7 December 2010 (Abstract).*

Catalá MG, *Izquierdo D*, *Romaguera R*, *Hammami S*, *Roura M*, *Paramio MT.* Selection of prepubertal sheep oocytes using brilliant cresyl blue test. *Reproduction, Fertility and Development, Vol. 23 No. 1 Pages 223 - 224, Published 7 December 2010 (Abstract).*

C4. ARTÍCULOS DE DIVULGACIÓN EN REVISTAS
Indicar: autor(es), título, referencia de la publicación.

Roser Morató, Dolors Izquierdo, Maria Teresa Paramio, Teresa Mogas. Vitrificación de blastocistos bovinos producidos in vitro en diferentes estadios de desarrollo/ vitrification of different developmental stages of bovine blastocysts produced in vitro. *Revista ASEBIR*, *Vol. 15 (2): 27-33. Diciembre 2010.*

C5. ARTÍCULOS DE REVISIÓN
Indicar: autor(es), título, referencia de la publicación.

Paramio MT. In vivo e in vitro embryo production in goats. Small Ruminant Research. 2010, 89 (2-3): 144-148

C6. LIBROS, CAPÍTULOS DE LIBROS Y MONOGRAFÍAS
Indicar: autor(es), título, referencia de la publicación.

Maria Teresa Paramio Nieto y Dolors Izquierdo. 2008*. Producción in vitro de embriones de animales de interés ganadero*. Treballs de la Societat Catalana de Biologia. Biologia de la reproducció / Mercè Durfort i Francesca Vidal, editores. Vol 58: 151-163

Maria Teresa Paramio y Dolors Izquierdo. 2010. *La Transgènesi en els animals de producció i el seu efecte sobre l'alimentació i la salut* . Treballs de la Societat Catalana de Biologia. Organismes modificats genèticament / Josep M. Casacuberta, editor. Vol 61: 121-133.

C7. CONFERENCIAS EN CONGRESOS, SIMPOSIOS Y REUNIONES (POR INVITACIÓN)
Indicar: autor(es), nombre del congreso, lugar de celebración, año.

- Maria Teresa Paramio. **9th Congress of International Goat Association**. Queretaro. Méjico. In vivo and in vitro embryo production in goats. 2 al 7 septiembre de 2008
- *Teresa Mogas.* X Congreso Internacional de la Sociedad de Andrología y Gametología de Chile (SAGACH). Santiago de Chile. Criopreservación de ovocitos y embriones bovinos**.** 12 al 14 de Enero 2011.
- *Teresa Mogas.* X Congreso Internacional de la Sociedad de Andrología y Gametología de Chile (SAGACH). Santiago de Chile. Vitrificación de ovocitos y embriones en animales domésticos. 12 al 14 de Enero 2011.

C8. PATENTES Y OTROS TÍTULOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
Indicar: autor(es), título, registro, entidad titular de la patente, año, países, clase.
Indicar cuáles están en explotación.

C9. OTROS RESULTADOS EXTRAORDINARIOS NO INCLUIDOS EN LOS APARTADOS ANTERIORES
Indicar: naturaleza y autor (es). Descríbalo brevemente en un máximo de 50 palabras.

D. CARÁCTER DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO (señalar hasta dos opciones)

( ) Teóricos **(x) Teórico-prácticos**

( ) Prácticos ( ) De inmediata aplicación industrial

E. COLABORACIONES

E1. SI EL PROYECTO HA DADO LUGAR A COLABORACIONES CON OTROS GRUPOS DE INVESTIGACIÓN, coméntelas brevemente.

Este proyecto ha dado lugar a la formación de un Grupo de Investigación Consolidado de la Generalitat de Catalunya:

Título del proyecto: Biotecnologia de la Reproducció en espècies ramaderes (BRER).
Identificador Oficial: 2009SGR0621
Entidad financiadora: Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació
Entidades participantes: Universitat Autònoma de Barcelona
Duración, desde: 01/10/2009 hasta: 31/12/2013 Cuantía: 50.960,00
Investigador responsable: Paramio Nieto, María Teresa
Número de investigadores participantes: 13

Además, se han realizado colaboraciones con otros grupos internacionales con el fin de realizar parte de los experimentos incluidos en el proyecto. Así, algunos de los becarios del grupo han obtenido becas de movilidad con distintos fines:

Centre for Advanced Technologies in Animal Genetics and Reproduction.
University of Sydney (Australia).
Dr. Chris Grupen
Julio 2007-Diciembre 2007

INRA-Tours.
Departamento de Genética.
Universidad de Tours (Francia).
Dr. Pascal Mermillod
Septiembre 2009-Diciembre 2009

INIA-Madrid
Departamento de Reproducción Animal.
INIA de Madrid (España)
Dr. Alfonso Gutiérrez-Adán
Mayo 2010

E2. SI HA PARTICIPADO EN PROYECTOS DEL PROGRAMA MARCO DE I+D DE LA UE Y/O EN OTROS PROGRAMAS INTERNACIONALES EN TEMÁTICAS RELACIONADAS CON LAS DE ESTE PROYECTO, indique programa, tipo de participación y beneficios para el proyecto.

Mencione las solicitudes presentadas al Programa Marco de la UE durante la ejecución del proyecto, aunque no hayan sido aprobadas.

Durante este proyecto hemos formado parte como miembros activos de la acción GEMINI (Maternal Interaction with Gametes and Embryos: FAO207) del programa europeo COST (European Cooperation in Science and Technology) el objetivo del cual es facilitar la cooperación entre científicos e investigadores europeos. Concretamente, la acción GEMINI pretende establecer una red de investigadores europeos que estudien los diferentes aspectos de la interacción materna con los gametos y embriones en diferentes especies con el objetivo principal de aumentar el conocimiento sobre las interacciones celulares así como las interacciones endo y paracrinas entre los gametos, embriones y el tracto reproductor durante los diferentes estadios del ciclo reproductivo y la gestación, tanto en casos fisiológicos como en estadios de nutrición o metabolismo maternal alterados.

F. PROYECTOS COORDINADOS [1]

Describa las actuaciones de coordinación entre subproyectos, y los resultados de dicha coordinación con relación a los objetivos globales del proyecto.

G. RELACIONES O COLABORACIONES CON DIVERSOS SECTORES

[1] A rellenar solo por el coordinador del proyecto.

G1. SI EN EL PROYECTO HA HABIDO COLABORACIÓN CON ENTES PROMOTORES OBSERVADORES (EPO) PARTICIPANTES:

1. Describa en detalle la relación mantenida con los EPO's, y la participación concreta de estos en el proyecto, especificando, si procede, su aportación al mismo en todos sus aspectos. (Si se ha modificado la relación y/o el apoyo del EPO, en relación con lo previsto a la aprobación del proyecto, descríbalo brevemente).

2. Describa, si procede, las transferencias realizadas al (los) EPO (s) de los resultados obtenidos, indicando el carácter de la transferencia y el alcance de su aplicación.

3. Indique si esta colaboración ha dado lugar a la presentación de nuevos proyectos o si se tiene intención de continuarla en el futuro. En caso afirmativo, describa brevemente cómo va a concretarse.

G2. SI EL PROYECTO HA DADO LUGAR A OTRAS COLABORACIONES CON EL ENTORNO SOCIOECONÓMICO (INDUSTRIAL, ADMINISTRATIVO, DE SERVICIOS, ETC.), NO PREVISTAS INICIALMENTE EN EL PROYECTO, descríbalas brevemente.

H. GASTOS REALIZADOS

H1. GASTOS REALIZADOS EN LA ÚLTIMA ANUALIDAD

Nota: ***Debe cumplimentarse este apartado independientemente de la justificación económica enviada por el organismo.***

1.- Indique el total de gasto realizado en el proyecto:

Concepto	**Total gasto de la anualidad** (€)
Personal	9.324,04
Costes de ejecución	43.244,65
TOTAL GASTO REALIZADO	53.568,69

2.- Comente brevemente si ha habido algún tipo de incidencia en este apartado que desee reseñar.

En el apartado de costes de ejecución nos encontramos con gastos de tres personas que se añadieron al proyecto:

1. Maria Gracia Catalá: consiguió una beca FPI de la UAB para hacer su tesis doctoral
2. Bladimir Córdova. Obtuvo una beca FPI para realizar su tesis doctoral de la UAB.
3. Sondes Hammami: Se ha incorporado en el último año a nuestro proyecto con una beca AECI para realizar la tesis doctoral.

La concesión de becas FPI suele estar supeditada a la existencia de un proyecto de investigación en activo. Durante los 3 años de vigencia de nuestro proyecto hemos podido obtener la concesión de 3 becarios predoctorales, alguno de ellos en el último año y como siempre pendientes de la obtención del siguiente proyecto para poder finalizar nuestros compromisos, también, con los doctorandos.

H2. GASTOS REALIZADOS DURANTE TODO EL PROYECTO

Nota: ***Debe cumplimentarse este apartado independientemente de la justificación económica enviada por el organismo.***

Euros

1. Gastos de personal (indicar número de personas, situación laboral y función desempeñada)
Roser Morató Molet, contratada como Técnico especialista de soporte a la investigación desde marzo 2008 a enero del 2009, realizando las funciones de:
- Preparación de medios de cultivo imprescindibles para la producción in vitro de embriones
- Realizar las metodologías de MIV-FIV-CIV
- Colaborar en las técnicas de LOPU (laparoscópico Ovum Pick Up)

.
Montserrat Roura Llerda contratada como Técnica especialista de soporte a la investigación desde octubre 2009 a julio 2010, realizando las funciones de:
- Preparación de medios de cultivo imprescindibles para la producción in vitro de embriones
- Realizar las metodologías de MIV-FIV-CIV
- Colaborar en las técnicas de LOPU (laparoscópico Ovum Pick Up)

Total 40.000,00€

2. Material inventariable (describir brevemente el material adquirido)
Buc de plástico de 4 cajones i armário alto de plástico para laboratorio
Dispositivo tirado DL3, base de rueda, accesorios tubos
VACUTIP esteriles

Total 13.973,9€

---

3. Material fungible (describir brevemente el tipo de material)

ALCOHOL PARC.DESNATURAL., ALPHAGAZ AGUJA MULTIPLE, GUANTES, CELULOSA, ACID PERCHLORIC, PBS, DULB (6X1000ML), PLACAS CORNING, GENTAMICIN SOL., MINERAL OIL EMBRYO, PECTIN, LAPIZ TUNGSTENO MARCADOR VIDRIO, PLUSET, ALLUSPRAY, DUPHAMOX, ESTRUMATE, SINCRO-GEST ESPONJA, HEPARIN, PHOSPHORUS, VASOCAN, TAPÓN CONO, TESTS DE CROMOSOMES DE CHROMBIOS GMBH, ALPHAGAZ 1 NITROGENO, FLUIDO SINTÉTICO DE OVIDUCTO, TUBOS, PLACA PETRI, FILTRO, TUBO CÓNICO, BUPREX, PUNTES VACUTIPS, SOL. TYRODES, NITROGEN, TONERS DE ECO-TONER, IN SITU CELL DEATH FLUOR., DIOXIDO DE CARBONO, MITROTRACKER, ANTIBIOTIC ANTIM., PIPETA, MICROTUBO,GUANTES, ISOFLO, UNIDAD CODA P/INCUBADOR, ESPONJA OVEJA SINCRO-GEST, FISIOLOGICO, PROPOFOL, LIPOPOLYSACCHARIDE, ACETIC ACID, PHOSPHATE, L-GLUTAM MEDIUM, PORTAOBJECTES, GUANTS, ISOFLO, DOLETHAL, PBS.DULB 500 ML, BUPREX 6 INY., PLUSET 500 U., DUPHAMOX 250 ML, PANTOMICINA 200 50 CC, MATRAZ ERLENMENER, SABÓ, ROSCOVITINE, DIMETHYL, PBS, DULB 10X500ML, FORRO INTERIOR DE LÁTEX, L-GLUTAM, WATER FOR EMBRYO TRANSFER, B-ESTRADIOL, CYSTEAMINE, GENTAMICIN SOLUTION 10 MG/ML, PERCOLL 250ML, FILTRO JERINGA ACRODISC 0,2 MICRAS, FILTRO MEMBRANA METRICEL, PHOSPHATE BUFFERED SALINE TABLET, LEPTIN, HUMAN RECOMBINANT, MEDIUM 199, DULBECCO PHOSPHATE, POLY-L-LYSINE, POLYOXYETHYKENESORBITAL, SB 43152 HYDRATE, IN SITU CELL DEATH FLUORESCEIN, BRILLIANT CRESYL, SODIUM TETRABORATE, E199W/ HEPES, VALORACIÓ TÈCNICA I CONÒMICA SUBS ELEMENTS FILTRAT
C.50 PORTAS 26X76 C.BISEL, ACIDO CLOHÍDRICO, MINERAL OIL EMBRYO, PECTIN FROM APPLE, CUBRE OBJETOS, FORMAMIDA PURIS, FETAL BOVINE, FOLLICLE STIMULATING, ESTRADIOL GAMM, LUTEINIZING, DULBECCO, PROPOFOL 1%, VENOFIX G-21, MANOREDUCTOR, MEDIUM 199, GENTAMICIN SOLUTION, METANOL P.A. ACS ISO REAG PH EUR 1000 ML, RELLOTGE AVISADOR, PAPER WYPALL, MINERAL OIL, DULBECCO, PHOSPHATE,LACTIC ACID, TRIZMA, MEDIUM 199, JERINGA 5ML 2 CUERPOS C/100 UND, HYALURONAN, DAPI II COUNTERSTAIN, TUBO FONDO REDONDO, LYSOZYME, TRIS-HCL. POLY-L-LYSINE, STERICAN 18G, BOMBILLA PARA MICROSCOPIO, DIMETHIL SULFOXIDE, D-VAL-LAU.LYS, HYPOTAURINA, GUANTE VASCO SURGICAL POWERED, TERMOMETRO VARILLA, GRADILLA APILABLE, ISOBA-VET, RNASEZAP 250ML, WIRETROL 1,5 DRUMMOND, OVIPURE TM TOP LAYER I BOTTON LAYER, EPIDERMAL, DIMETHYL, PRO, MIDAZOLAM NORMON, RQ1 RNA-FREE DNASE, FREIGHT, GASES PUROS Y MEZCLAS, SHXGR10 SHEEP PAINTING PROBE FOR X CHROMOSOME LABEL GREEN (FITC) 10 TESTS, PAINTING PROBE FOR SHEEP CHRMOSOME 20, LABEL AQUA (DAEC) 10 TESTS (SH20AQ10), AGUA PARA EMBRYU TRANSFER, MIDAZOLAM, IN SITU CELL DEATH FLUORESCEIN, WATER, MEDIUM, ALBUMIN BOVINE, PHOSPHATE, DIMETHYL, WATER, GUANTES LATEX, PLACA CULTIVO, WIRETROL, MINERAL OIL EMBRYO TESTED, PHYLLOQUINONA, CASAMINO, WATER, ACETYL CHOL, MESACUP, C02 SOLIDO PELLETS, FILTRO, BUTIROMETRO, HOJA BÍSTURI, PLACA CULTIVO, TRANS-EPOXYSUCCINYL, MEDIUM 199, CYSTEAMINE, BRIJ 35, UROKINASE, MIDAZOL NORMON 15 MG EFG 5AMP, PHOSPHATE BUFFERED SALINE TABLET, PORTA-OBJETOS CON FRANJA DESENGRASADOS, PLACAS 4 POZOS NUNC, PYROMARK GOLD, BINDING, WASH, ANNEALING, PLACA CORNING, POLYVINYLPYRROLIDONE , FICOLL, VWR- RACS LADOS COLORES, KEY LAB, FILTRO MEMBRANA METRICEL, FISHER-SCIENTIFIC- SOLUCION PATRON, PIPETA PASTEUR, DRYSHIPPER, PERCOLL 250ML, LAMPARA Y OLI, CRYOTOP GREEN, RACK P. AMARILLAS,

Total 39.356,77€

---

4. Viajes y dietas (describir brevemente)

Inscripciones Congreso AERA de T.Mogas, R.Morató, D.Izquierdo. 22-25 OCT. 2008 A Gijón.
T.Mogas: Billete avión ZURICH 13-17/07/08 Congreso

M.D.Izquierdo/R.Morató: BUDAPEST 13-17/07/08 Billete avión
Viage T.Mogas i R.Morató, AETE MEETING en Pau (FRANCIA), 11-14 SET. 08
Pago inscripción 24th Meeting Embry Roser Morató i Teresa Mogas
ICAR CONGRESS 2008, Inscripciones R.Morató, T.Mogas i D.Izquierdo.. 13-17 JUL./08 BUDAPEST
Diversos viajes a Castellbisbal para recogida de muestras al matadero.
Inscripciones, estancia y desplazamientos de Teresa Mogas, Maria Català, Bladimir Córdova a las JORNADAS DE ESTUDIO DE AIDA ZARAGOZA 12-13/05/2009
Inscripción R. Morató I.INTERNAT.CONGRESS ON CONTROV.IN CRYOP.OF STEM CELLS, REPROD. CELLS, TISSUE AND ORGANS (CRYO)

Asistencia CONGRESO AETE 2010: Avión BCN-HELSINKI-BCN 09-13/09/2010, más alojamiento M.CATALÀ, B.CORDOVA, T.MOGAS, R.MORATÓ, T.PARAMIO

MADRID 22.04.10 REUNION PROYECTO, T. Mogas, R. Morató.
Inscripciones de M.T. Paramio, T.Mogas, R. Morató, M. Gracia, B. Córdova en el 26th SCIENT.MEET.OF THE EUROP. EMBRYO TRANSF.ASSOC.
MT.Paramio: ZARAGOZA 22.10.10 Recogida de muestras

Total 10.547,37€

---

5. Otros gastos (describir brevemente)

Instalación y conexión caseta de gases, fotocopias, renovación botellas CO2 y de nitrógeno,
Revisión artículos científicos, correos, gastos de mensajería.
Servicio tratamiento de imágenes, eliminación de residuos animales
Servicio de microscopía.
Uso de furgoneta de la FAC. VETERINÀRIA
Validación y cuantificación PCR'S 1er. Semestre 2010

IETS PROFESSIONAL MEMBERSHIP DUES (JAN 1 - DEC 31 2009)
CUOTA ANUAL MEMBERSHIP 2008 Y 2009
ECAR MEMBERSHIP FEE FOR 2010
FED.ANIM.SCIENCE SOC. IETS PROFESSIONAL MEMBERSHIP 2010

Total 16.121,96€

---

6. Costes indirectos

Total 25.200,00€

---

7. Dotación adicional o complementos salariales, si procede

Total €

TOTAL GASTOS EJECUTADOS DEL PROYECTO 145.200,00€

I. INFORMACIÓN CORRESPONDIENTE A LA ÚLTIMA JUSTIFICACIÓN DE GASTO.

I1. PERSONAL ACTIVO EN EL PROYECTO DURANTE EL ÚLTIMO PERÍODO DE JUSTIFICACIÓN.

En el cuadro siguiente debe recogerse la situación de todo el personal del o de los Organismos participantes que haya prestado servicio en el proyecto en la anualidad que se justifica, o que no haya sido declarado anteriormente, y cuyos costes (salariales, dietas, desplazamientos, etc.), se imputen al mismo.
Si la persona estaba incluida en la solicitud original, marque "S" en la casilla correspondiente y no rellene el resto de las casillas a la derecha.
Indique en la casilla "Categoría Profesional" el puesto de trabajo ocupado, el tipo de contratación: indefinida, temporal, becarios (con indicación del tipo de beca: FPI, FPU, etc.), etc.
En el campo "Función en el proyecto" indique el tipo de función/actividad realizada en el proyecto, (p. e., investigador, técnico de apoyo,…).

Recuerde que:
- En este capítulo solo debe incluir al personal vinculado a los Organismos participantes en el proyecto. Los gastos de personal externo (colaboradores científicos, autónomos…) que haya realizado tareas para el proyecto debe ser incluido en el capítulo de "Varios".
- Las "Altas" y "Bajas" deben tramitarse de acuerdo con las "Instrucciones para el desarrollo de los proyectos de I+D" expuestas en la página web del MICINN.

						Si no se ha incluido en solicitud original:		
Apellido 1	**Apellido 2**	**Nombre**	**NIF/NIE**	**Catg.ª Profesional**	**Incluido en solicitud original**	**Función en el proyecto**	**Fecha de Alta**	**Observaciones**
Paramio	**Nieto**	**Maria Teresa**	**12236218B**	**Catedrática Universidad**	**si**			
Mogas	Amoros	Maria Teresa	77783804N	Profesora Titular	si			
Izquierdo	Tugas	Dolors	33964211L	Profesora Agregada	si			
Morato	Molet	Roser	33951176 W	Técnica Postdoctoral	si			
Romaguera	Matas	Roser	40534913N	Becaria-FPI Generalitat Catalunya	si			
Palomo	Peiro	Maria Jesus	43424052Y	Profesora Lectora	si			
Catala		Maria Gracia	X9165682K	Becaria FPI-UAB	No	Doctoranda	Marzo 2008	Obtuvo la beca después de concedido el proyecto

Cordova		Bladimir	X7444410-T	Becario FPI-UAB	No	Doctorando	Julio 2007	Obtuvo la beca después de concedido el proyecto
Hammami		Sondes	X7148635 M	BecariaFPI-AECID	No	Doctoranda	Octubre 2009	Obtuvo la beca después de concedido el proyecto

I2. GASTOS DE EJECUCIÓN: MODIFICACIONES DE CONCEPTOS DE GASTO CON RESPECTO A LA SOLICITUD ORIGINAL PARA EL ÚLTIMO PERÍODO DE JUSTIFICACIÓN.

Recuerde que los trasvases entre gastos de personal y gastos de ejecución deben tramitarse de acuerdo con las "Instrucciones para el desarrollo de los proyectos de I+D+i" expuestas en la página web del MICINN.

a) Equipamiento:

En el cuadro adjunto, rellene una línea por **cada equipo adquirido** incluido en la justificación de gastos y **no previsto en la solicitud inicial** que dio lugar a la concesión de la ayuda para el proyecto, y justifique brevemente su adquisición. Si se ha adquirido un equipo en sustitución de otro que figuraba en la solicitud de ayuda inicial (por mejorar sus prestaciones, por obsolescencia del anterior…), indíquelo también en la casilla correspondiente.

Identificación del equipo	Importe	Justificación adquisición	Sustituye a ...(en su caso).

b) Viajes/Dietas:

En el cuadro adjunto se justificará la imputación de gasto en viajes y dietas solo en el caso de que este tipo de gasto **no estuviera previsto en la solicitud inicial**

c) Material fungible:

Se describirá y razonará en el siguiente cuadro la adquisición del material fungible incluido en la justificación de gastos, sólo cuando este tipo de gasto **no estuviera previsto en la solicitud original.**

d) Varios:

Se describirán en el siguiente cuadro los gastos varios más relevantes incluidos en la justificación de gastos y **no previstos en la solicitud original,** justificando brevemente su inclusión. En este apartado se incluirá, entre otros, al personal externo y, en el caso de que el gasto justificado se refiera a colaboraciones científicas, se identificará al colaborador.

FIN DEL INFORME FINAL

ARTICLE IN PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Theriogenology xx (2011) xxx

Theriogenology

www.theriojournal.com

Prepubertal goat oocytes from large follicles result in similar blastocyst production and embryo ploidy than those from adult goats

R. Romaguera[a], X. Moll[b], R. Morató[b], M. Roura[a], M.J. Palomo[b], M.G. Catalá[a], A.R. Jiménez-Macedo[a], S. Hammami[a], D. Izquierdo[a], T. Mogas[b], M.T. Paramio[a,*]

[a] *Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain*
[b] *Departament de Medicina i Cirurgia Animal, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain*

Received 3 August 2010; received in revised form 15 December 2010; accepted 21 December 2010

Abstract

Developmental competence of oocytes from prepubertal females is lower than those from adult females. Oocyte development competence is positively related to follicular diameter. Most of the follicles of prepubertal goat ovaries are smaller than 3 mm. The aim of this study was to compare oocytes of two follicle sizes (< 3 mm and ≥ 3 mm) from prepubertal goats with oocytes from adult goats in relation to their *in vitro* production and quality of blastocysts. Oocytes from prepubertal goats were obtained from slaughterhouse ovaries and selected according to the follicle diameter whereas oocytes from adult goats were recovered *in vivo* by LOPU technique without prior selection of follicle size. COCs were IVM for 27 h, IVF at the conventional conditions with fresh semen and presumptive zygotes were cultured in SOF medium for 8 days. Blastocysts obtained were vitrified and after warming their blastocoele re-expansion and the ploidy by FISH technique were assessed. We found significant differences between blastocysts yield of oocytes recovered from follicles smaller than 3 mm of prepubertal goats compared to those from adult goats (5.45% vs 20. 83%, respectively) however, these differences disappear if oocytes were recovered form large follicles (18.07%). A total of 28 blastocysts were analysed and 96.43% showed mixoploidy. Age did not affect the number of embryos with abnormal ploidy or blastocyst re-expansion after warming. Furthermore, the percentage of diploid blastomeres per embryo was similar in the 3 groups studied, adult, prepubertal from follicles ≥ 3 mm and < 3 mm (68.6%, 80.8% and 73.6%, respectively). In conclusion, IVP of blastocysts coming from follicles larger than 3 mm of goats 45 days old were not different to the blastocysts produced from adult goats, both in terms of quantity and quality.
© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Prepubertal; Goat; Follicle size; FISH; IVEP

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Education and Science (Project number: AGL2007-60227/GAN) and from the Generalitat de Catalunya (2006 FPI 00033). The authors wish to thank Professor José Luís Alabart for his statistical assistance.

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Theriogenology 74 (2010) 1050–1059
Theriogenology
www.theriojournal.com

Oocyte secreted factors improve embryo developmental competence of COCs from small follicles in prepubertal goats

R. Romaguera[a], R. Morató[b], A.R. Jiménez-Macedo[a], M. Catalá[a], M. Roura[a], M.T. Paramio[a], M.J. Palomo[b], T. Mogas[b], D. Izquierdo[a,*]

[a] Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain
[b] Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain

Received 8 March 2010; received in revised form 28 April 2010; accepted 29 April 2010

Abstract

Oocytes secrete soluble paracrine factors called Oocyte Secreted Factors (OSFs) which regulate the cumulus cell phenotype. Follicle populations in ovaries from prepubertal females have smaller diameters than their adult counterparts. Oocytes from small follicles are less competent than those from large follicles. The aim of this study was to investigate, in prepubertal goats, the effect of OSFs secreted by denuded oocytes (DOs) from small (<3 mm) or large (≥3 mm) follicles during IVM on embryo development and the blastocyst quality of cumulus-oocyte complexes (COCs) from small follicles and to determine if GDF9 participates in this process. Treatment groups were: (A) COCs non selected by their follicle size (control group); (B) cumulus oocytes complexes from small follicles (SFCOCs), (C) cumulus oocytes complexes from small follicles co-cultured with denuded oocytes from small follicles (SFCOCs + SFDOs), and (D) cumulus oocytes complexes from small follicles co-cultured with denuded oocytes from large follicles (SFCOCs + LFDOs). The effect of the addition of kinase inhibitor SB-431542, which antagonizes GDF9, was tested in A, C, and D treatment groups. Co-cultured SFCOCs with SFDOs or LFDOs significantly augmented the blastocyst rate in comparison to SFCOCs alone (15.77%, 17.39% vs. 10.31%, respectively). Blastocysts from SFCOCs + LFDOs group showed higher rates of tetraploid nuclei than blastocysts from SFCOCs and the control group (14.43% vs. 5.45% and 5.24%, respectively; $P < 0.05$). However, we did not observe differences in the hatching rate, mean cell number or embryo cryotolerance ($P > 0.05$) between the four treatment groups. The addition of SB-431542 during IVM did not have any effect on blastocyst rate ($P > 0.05$). In conclusion, in prepubertal goats, COCs with a low embryo developmental competence as a consequence of follicle size can be improved by coculturing them with denuded oocytes from both small and large follicles. GDF9 does not seem play a role in this improvement.
© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Prepubertal goat; Follicle size; Oocyte Secreted Factors; GDF9; Blastocyst

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Education and Science (Project number: AGL2007-60227/GAN) and from the Generalitat de Catalunya (2006 FPI 00033).

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Theriogenology 74 (2010) 364–373
Theriogenology
www.theriojournal.com

Effect of follicle diameter on oocyte apoptosis, embryo development and chromosomal ploidy in prepubertal goats

R. Romaguera[a], A. Casanovas[a], R. Morató[b], D. Izquierdo[a], M. Catalá[a], A.R. Jimenez-Macedo[a], T. Mogas[b], M.T. Paramio[a,*]

[a] Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain
[b] Departament de Medicina i Cirurgia Animal, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain

Received 12 November 2009; received in revised form 25 January 2010; accepted 21 February 2010

Abstract

The aim of this study was to assess the following parameters in prepubertal goat oocytes of different follicle diameter (≥3 mm, <3 mm, control): oocyte diameter, early (Annexin-V) and late (TUNEL) apoptosis, embryo development and chromosomal ploidy of these blastocysts using Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). Before *in vitro* maturation, oocytes were measured and stained with Annexin-V or TUNEL. The rest of the oocytes were matured, fertilized, and cultured *in vitro* for 8 days. Oocytes from follicles of ≥3 mm showed greater mean oocyte diameter (128.27 ± 7.20 μm vs. 125.35 ± 7.59 μm), higher percentages of TUNEL positive (42.86 vs. 24.23%), higher cleavage (47.85 ± 3.98 vs. 23.07 ± 2.44 %) and blastocyst rates (19.77 ± 3.04 vs. 4.11 ± 1.10 %) than oocytes from follicles of <3 mm.. Blastocyst mean cell numbers did not show differences between follicular groups (123.83 ± 49.62 vs. 104.29 ± 36.09 for follicles of ≥3 mm and <3 mm, respectively). A total of 54 blastocysts with 7084 nuclei were hybridized with specific probes to chromosomes X and Y. Ninety-eight percent (98%) of the embryos presented at least one cell carrying an abnormal number of chromosomes, but 78% of them presented less than 25% of chromosomal abnormal cells. No differences in the percentage of blastocysts with abnormal ploidy were found in embryos produced from oocytes of different follicle diameter.
© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Goat; Follicle diameter; Oocyte; Apoptosis; Blastocyst; Chromosomes.

1. Introduction

was lower in prepubertal than in adult goat oocytes. These deficiencies could be attributed to cytoplasmic, ultrastruc-

A

cknowledgments

This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Education and Science (Project number: AGL2007-60227-CO2-01) and the Generalitat de Catalunya (2006FPI 00033).

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Theriogenology 74 (2010) 1341–1348
Theriogenology
www.theriojournal.com

Effect of the addition of insulin-transferrin-selenium and/or L-ascorbic acid to the *in vitro* maturation of prepubertal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development

B. Córdova[a], R. Morató[a], D. Izquierdo[b], T. Paramio[b], T. Mogas[a,*]

[a] *Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain*
[b] *Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain*

Received 18 February 2010; received in revised form 14 May 2010; accepted 2 June 2010

Abstract

This study examines the effects of adding insulin-transferrin-selenium (ITS) and/or L-ascorbic acid (ASC) to a conventional medium for maturing prepubertal calf oocytes on chromosome organization, cortical granule (CG) distribution, and embryo development to the blastocyst stage. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were matured in medium TCM 199 containing PVA and EGF (control), and supplemented with ITS and/or ASC for 12 or 24 h at 38.5 °C in a 5% CO_2 atmosphere. Calf oocytes matured with ITS + ASC or ASC for 12 h showed significantly higher percentages of peripherally distributed CG (83.3% and 86.2% respectively) than control oocytes (71.4%) or those matured with ITS alone (71.4%). No effects on chromosome organization were detected. Conversely, 24 h of supplementation did not affect CG distribution patterns, while the addition of ASC gave rise to significantly higher percentages of oocytes showing a normal alignment of their chromosomes (72.9%) compared to controls (58.7%). At 48 hpi, similar cleavage rates were observed among treatments regardless of the treatment time. However, the presence of ITS + ASC for 12 h rendered significantly higher blastocyst rates than those recorded in the remaining groups. Supplementation for 24 h with ITS or ITS + ASC had no significant effects on the percentage of blastocysts obtained, while the presence of ASC significantly reduced the proportions of embryos developing to the blastocyst stage. Our data suggest that ITS plus L-ascorbic acid supplementation during the first 12 h of *in vitro* maturation improves cytoplasm maturation and the developmental competence of embryos produced from prepubertal calf oocytes.
© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Calf; Nuclear maturation; Cortical granules; Chromosomal configuration

Acknowledgements

This study was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Project No. AGL2007-60227/GAN). We thank ASEAVA (Llanera, Asturias, Spain) for supplying the sperm doses and Dr. David Solà for his helpful advice in the statistical analysis.

Animal Reproduction Science 116 (2009) 95–106

Contents lists available at ScienceDirect

Animal Reproduction Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anireprosci

Effect of the apoptosis rate observed in oocytes and cumulus cells on embryo development in prepubertal goats

B. Anguita[a], M.T. Paramio[a], R. Morató[a], R. Romaguera[a], A.R. Jiménez-Macedo[a], T. Mogas[b], D. Izquierdo[a,*]

[a] Department of Animal and Food Sciences, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain
[b] Department of Animal Medicine and Surgery, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 17 October 2008
Received in revised form 14 January 2009
Accepted 19 January 2009
Available online 24 January 2009

Keywords:
Apoptosis
Oocyte
Cumulus cells
Prepubertal goat

ABSTRACT

Oocyte quality is the main factor that determines blastocyst yield; any factor that could affect it, such as apoptosis, could impair subsequent embryonic development. Our aim was to investigate the incidence of apoptosis in prepubertal goat oocytes and cumulus cells, assessed by Annexin-V staining and TUNEL assay, and their effect on embryo development. Oocyte-cumulus complexes (COCs) from slaughtered females were collected and classified depending on COC morphology as: Healthy (H) and Early Atretic (EA). Each one of these groups was classified depending on oocyte diameter: A: 110–125 μm, B: 125–135 μm and C: >135 μm. The COCs were IVM for 27 h, IVF with fresh semen and IVC for 8 days after insemination. Apoptosis analyses were performed before and after

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Education and Science (Project number: AGL2007-60227/GAN), the Universitat Autònoma de Barcelona (Grant number: EME2004-25) and the Generalitat de Catalunya (2006FIC 00187).

CSIRO PUBLISHING

www.publish.csiro.au/journals/rfd *Reproduction, Fertility and Development*, 2010, **22**, 1141–1147

Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of *in vitro*-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages

Roser Morató[A,C], *Dolors Izquierdo*[B], *Maria Teresa Paramio*[B] *and Teresa Mogas*[A]

[A]Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain.
[B]Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain.
[C]Corresponding author. Email: roser.morato@uab.es

Abstract. Two experiments were designed to determine the ability of *in vitro*-cultured blastocysts at different stages of development to survive the vitrification procedure using cryotop devices. Day 7 and Day 8 embryos were classified as non-expanded, expanded or hatching and/or hatched blastocysts. In the first experiment, we examined the survival rate of vitrified–warmed blastocysts after 3 h incubation in synthetic oviducal fluid (SOF) medium. In the second experiment, vitrified–warmed blastocysts were evaluated using the terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP–digoxigenin nick end-labelling (TUNEL) technique to detect nuclei with damaged DNA. In both experiments, results for cow and calf blastocysts were compared. No differences in survival rates were observed after vitrification of Day 8 expanded (52.4%) and hatched (50%) cow blastocysts or Day 8 expanded (54.5%) and hatched (59.4%) calf blastocysts. When embryos were vitrified on Day 7, survival rates of 78.4% and 66.7% were observed after warming expanded and hatched cow blastocysts, respectively, compared with rates of 80% and 76.9%, respectively, for calf blastocysts. Lowest survival rates were recorded for non-expanded blastocysts (26%–54%) compared with the other developmental stages, particularly those vitrified at Day 8 (≤40%). The DNA integrity index obtained after vitrification–warming was comparable to that for control fresh blastocysts, regardless of the length of embryo culture, the developmental stage of the embryo or the source of the oocytes. Our findings suggest that the cryotop vitrification method is particularly useful for the cryopreservation of blastocysts presenting with a high degree of expansion (expanded or hatched blastocysts), particularly when vitrification is performed after 7 days of *in vitro* embryo culture.

Additional keywords: bovine, cryopreservation, embryo, prepubertal.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Education and Science (project no. AGL2007–60227/GAN) and from the Universitat Autònoma de Barcelona (grant no. EME2004–25). The authors are grateful to ASEAVA (Llanera, Asturias, Spain) for supplying doses of frozen bull spermatozoa. The authors also acknowledge the Servei de Microscopia of the Universitat Autònoma de Barcelona for technical assistance and standardisation of the confocal imaging procedure.

251 SELECTION OF PREPUBERTAL SHEEP OOCYTES USING BRILLIANT CRESYL BLUE TEST

M. G. Catalá, D. Izquierdo, R. Romaguera, S. Hammami, M. Roura, and M. T. Paramio

Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

The aim of this study was to evaluate the utility of the brilliant cresyl blue (BCB) test as an indirect measure of oocyte growth to select competent prepubertal sheep oocytes for *in vitro* embryo production. The BCB stain allows the determination of glucose–6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity, an enzyme with decreased activity in oocytes that have finished their growth phase. Oocytes were obtained after slicing the surface of lamb ovaries (2–5 months old) obtained from a local abattoir. Oocytes with more than 3 compact cumulus layers and homogeny cytoplasm were selected and stained with different concentrations of BCB diluted in PBS (13-, 26-, 39-, and 52-μM BCB) during 60 min at 38.5°C in a humidified air atmosphere. Oocytes were classified into groups depending on their cytoplasm coloration: oocytes with blue cytoplasm or grown oocytes (BCB+) and oocytes without blue coloration or growing oocytes (BCB−). Oocytes were matured in an enriched TCM-199 medium for 24 h at 38.5°C and 5% CO_2 in a humidified atmosphere. Oocyte diameter was also measured. Matured oocytes were partially denuded and transferred to fertilization medium (SOF) supplemented with 10% of oestrous sheep serum. Fresh semen was kept at room temperature (25°C) for 1 h. Highly motile spermatozoa were selected by using Ovipure density gradient (Nidacon EVB S.L.), and oocytes were fertilized with 1×10^6 sp mL^{-1}. After 20 h postinsemination, presumptive zygotes were cultured for 8 days in SOF with 10% of fetal bovine serum at 38.5°C, 5% CO_2, and 90% N_2. Data was analysed by performing Fisher's exact test for blastocyst production and ANOVA with Tukey's post-test for oocyte diameter. Table 1 shows the percentage of BCB-stained oocytes and their embryo development. In this study oocytes exposed during 60 min to 13-μM BCB showed a higher percentage of embryos reaching blastocyst stage than did those in the control group ($\leq$0.01). In other species such as goats (Rodriguez-Gonzalez *et al.* 2002 Theriogenology **57**(5), 1397–1409) and cattle (Alm *et al.* 2005 Theriogenology **63**(8), 2194–2205), the best protocol for the oocyte selection was the use of 26-μM BCB during 90 min. Oocyte diameter showed significant differences between BCB− with BCB+ and control group (110 μm, 134 μm, and 121 μm, respectively, $\leq$0.001). In conclusion, using 13 μM of BCB during 60 min is a suitable technique for increasing embryo blastocyst rates using lamb oocytes.

Table 1. Effect of BCB[1] concentration on embryo development of lamb oocytes

Item	BCB	BCB+ %	Inseminated oocytes	Cleavage (%)	Blastocyst (%)
Control			174	116 (66.7)^{ab}	11 (6.3)^{a}
13 μM	+	19^{a}	42	33 (78.6)^{a}	8 (19.1)^{b}
	−		181	117 (64.6)^{ab}	18 (9.9)^{ab}
26 μM	+	28^{b}	55	36 (65.5)^{abc}	7 (12.7)^{ab}
	−		136	81 (59.6)^{b}	8 (5.9)^{a}
39 μM	+	36^{b,c}	70	40 (57)^{b}	6 (8.6)^{ab}
	−		136	95 (69.9)^{abc}	11 (8.1)^{ab}
52 μM	+	42^{c}	124	80 (64.5)^{abc}	10 (8.1)^{ab}
	−		151	80 (53)^{b}	7 (4.6)^{a}

$^{a-c}$Values with different superscripts differ significantly ($P \leq 0.05$), Fisher's test, GraphPad InStat.
[1]BCB = brilliant cresyl blue.

The grant sponsor was the Spanish Ministry of Science and Innovation, Code: AGL2007-60227-CO2-01.

Reproduction, Fertility and Development, Vol. 23 No. 1 Pages 223 - 224, Published 7 December 2010

260 *IN VITRO* DEVELOPMENTAL COMPETENCE OF PREPUBERTAL GOAT OOCYTES CULTURED IN GROWTH MEDIUM

S. Hammami, R. Romaguera, M. Roura, M. G. Català, R. Morató, T. Mogas, M. T. Paramio, and D. Izquierdo

Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

The prepubertal goat ovary presents a large number of small oocytes with a compromised competence to develop up to blastocyst stage. In pigs (Wu *et al.* 2006), using growth medium (GM) composed by low hormone concentrations, ascorbic acid, and insulin transferrin selenium (ITS) during the first 24 h of *in vitro* maturation (IVM) improved embryo development of small oocytes. The aim of this study was to test the GM in small prepubertal goat oocytes in order to increase blastocyst yield. The cumulus–oocyte complexes (COC) were recovered from prepubertal (1–2 months old) goat ovaries by slicing. The COC with a compact cumulus and homogeneous cytoplasm were selected and classified into 2 categories based on oocyte diameter: <125 µm and ≥125 µm. The ≥125 µm oocytes were matured in groups of 25 to 30 COC/100 µL drops of conventional IVM medium covered with mineral oil for 24 h (Treatment A). This medium was TCM-199 supplemented with 10% donor bovine serum, 10 µg mL^{-1} FSH, 10 µg mL^{-1} LH, 1 µg mL^{-1} 17β-oestradiol, and 100 µM cysteamine. The <125 µm oocytes were distributed into 3 experimental groups: Treatment B, COC matured in the conventional IVM medium; Treatment C, COC cultured in GM (TCM-199, 10% donor bovine serum, 0.04 µg mL^{-1} FSH, 0.04 µg mL^{-1} LH, 0.004 µg mL^{-1} 17β-oestradiol, 100 µM cysteamine, 100 µg mL^{-1} ascorbic acid, and 5 µL mL^{-1} ITS) for 12 h before placement for other 12 h in the conventional IVM medium, all drops of growth or maturation medium were covered with mineral oil; Treatment D, COC cultured during the first 12 h in GM and other 12 h into the conventional medium supplemented with 100 µg mL^{-1} ascorbic acid and 5 µL mL^{-1} ITS. After IVM, oocytes were fertilized for 24 h with a sperm concentration of 4×10^6 spz mL^{-1}. Presumptive zygotes were cultured in SOF for 9 days. The cleavage rate was evaluated at 48 h post-insemination and blastocyst percentages at the final *in vitro* embryo culture (treatments A, B, C: 5 replicates; treatment D: 4 replicates). The results are shown in the Table 1. Cleavage and embryo development did not show different results when we compared small oocytes matured in GM to those matured in conventional IVM medium. However, the biggest oocytes (≥125 µm) showed the highest percentage of blastocyst development. The current study shows that the culture of small prepubertal goat oocytes in GM does not improve blastocyst yield.

Table 1. Effect of growth medium on embryo development of small oocytes (<125 µm) from prepubertal goats

Oocyte maturation treatment	Oocyte diameter	No. oocytes	No. of cleaved oocytes	No. of blastocyst
Treatment A	≥125 µm	305	171 (56.38)	63 (20.99)[a]
Treatment B	<125 µm	298	114 (38.14)	31 (10.42)[b]
Treatment C	<125 µm	309	128 (42.20)	30 (9.70)[b]
Treatment D	<125 µm	182	67 (37.13)	18 (10.04)[b]

[a,b]Values in the same column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$). The analysis was performed using PROC GLM.

The grant sponsor was the Spanish Ministry of Science and Innovation, Code: AGL2007-60227-CO2-01.

Reproduction, Fertility and Development, Vol. 22 No. 1 Pages 323 - 324, Published 8 December 2009

366 SEXING OF GOAT BLASTOCYSTS PRODUCED IN VITRO BY FISH USING CHROMOSOME X AND Y OVINE SPECIFIC PROBES

A. Casanova A, F. Vidal A, R. Romaguera A, R. Morato A, M. Catala A, D. Izquierdo A, T. Moges A, M. T. Paramio A

University Autonomus of Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract

The aim of this study was to test a FISH approach using ovine-painted probes specific for the chromosomes X and Y, on goat interphase and metaphase nuclei of blastocyst cells. Oocytes of prepubertal goats were recovered at a slaughterhouse and selected by morphological criteria. Oocytes were matured in TCM-199 supplemented with hormones, serum and cysteine at 38.5°C for 27 h. IVM-oocytes were fertilized in vitro and the presumptive zygotes were cultured for 10 days in SOF with 10% FCS at 38.5°C, 5% CO2 and 5% O2. The blastocyst nuclei were spread using a modified Tarkowski method (1966). Briefly, individual embryos were immersed into hypotonic solution for 5 min, followed by fixative solution of methanol/acetic acid (Carnoy's solution) until the embryos acquired a transparent appearance. Next, the embryos were transferred to a Superfrost plus Slide (Menzel Gläser,

Braunschweig, Germany) in a small droplet mixture of distilled water and Carnoy The zona pellucida and the blastomere cytoplasm dissolved gradually and Carnoy solution was added dropwise to the slide before the nuclei dried out. The morphology and total number of nuclei in each embryo were analyzed under phase contrast microscope and stored at -18°C. Embryos with appropriate fixation were then subjected to hybridization with ovine-painted probes specific to chromosomes X (Fluorocrom green-FITC) and Y (Fluorocrom orange-TAMRA) (Chrombios-Molecular Cytogenetics GmbH, Raubling, Germany) according to the manufacturers protocol and adjusted for the caprine species. Briefly, slides were then incubated at 60°C for 1 h. The chromosomal DNA was then denatured by immersing slides in 70% formamide/30% 2 × SSC at 70°C for 1.5 min, and immediately dehydrated in an ethanol series (70%, 90%, and 100%), 4 min duration per solution and air dried. In parallel, X- and Y-probes were added to the hybridization solution (50% deionized formamide, 10% dextran sulfate, 2 × SSC) and denatured at 75°C for 10 min. Aliquots (0.5 to 1.5 µL) of this solution were placed on each slide and sealed with a coverslip and glue prior to incubation at 37°C (Hybrite; Vysis Inc, Dowers Grove, IL, USA). After 22 to 24 h the coverslip was removed and the slides were washed three times. The first and third washes were performed with 2 × SSC at room temperature while the second wash was in a 0.4 × SSC/0.1% Tween at 73°C for 3 min. Nuclear DNA was counterstained with diamino-phenyl-indole solution (DAPI) and examined with a fluorescence microscope (Olympus BX61, Olympus America Inc., Melville, NY, USA) equipped with appropriate filters. From a total of 69 blastocysts, 11 355 blastomeres were analyzed and 7,825 were correctly hybridized (68.9%). The results of the embryo sexing were: 24 embryos XX, 11 XY, 22 polyploid embryos (of which 13 presented more than 80% of cells XX), 3 haploid embryos (X0), 2 tetraploid embryos, and 5 no result. In summary, goat blastocysts were successfully sexed using FISH with painted ovine X- and Y-specific probes.

Reproduction, Fertility and Development 22(1) 339–340 Published: 8 December 2009

354 EFFECT OF OOCYTE-SECRETED FACTORS (OSF) ON EMBRYO DEVELOPMENT OF OOCYTES FROM SMALL FOLLICLES OF PREPUBERTAL GOATS

R. Romaguera [A], A. R. Jiménez-Macedo [A], D. Izquierdo [A], R. Morató [A], M. Català [A], M. Roure [A], M. J. Palomo [A], M. T. Paramio [A]

University Autonomous of Barcelona, Spain

Abstract

Prepubertal goat ovaries contain a great number of small follicles, between 2.5 and 3 mm in diameter (Martino A *et al.* 1994 Theriogenology 41, 969-980). Oocyte-secreted factors (OSFs) act on granulosa cells to perform multiple functions required for an appropriate development of the oocyte. In bovines, co-culture of COCs with denuded oocytes (DOs) during IVM improved COCs embryo development dueto OSFs secreted byDOs (Hussein T *et al.* 2006 Dev Biol. **296**, 514-521). In each step of follicle growth, the OSFs secreted are different (Eppig JJ *et al.* 2001 Reproduction. 122, 829-838). Our hypothesis is that oocytes from small follicles could improve their embryo development by co-culturing with DOs which secrete additional OSFs. Oocytes from prepubertal goats were classified according to their follicular origin: large follicles (>3 mm), small follicles (<3 mm), and control (oocytes recovered by slicing technique and selected by their morphology). The COCs from small follicles were divided in 3 groups and each one transferred into 150-µL droplets of IVM (TCM-199 with serum, hormones and cysteamine): 1) 30 COCs alone (small group); 2) 30 COCs co-cultured with 75 denuded oocytes from small follicles (SDO group); 3) 30 COCs co-cultured with 75 denuded oocytes from large follicles (LDO group). After 27 h of IVM, COCs were fertilized *in vitro* and the presumptive zygotes were cultured for 8 days in SOF with 10% FCS. Two samples of oocytes were used as control groups: oocytes fertilized (IVF group) and oocytes activated (activated group).At 48 h and 8 days post-insemination (pi), respectively, cleavage and blastocyst rates were recorded. Results are shown in Table 1. Differences between treatment groups were assessed using Fisher's exact test (Graph-Pad software, San Diego, CA, USA). Values with $P < 0.05$ were considered statistically significant. Oocytes from small follicle had a significantly lower cleavage and blastocyst rates than IVF and activation oocyte groups. The co-cultured of COCs with

SDOs and LDOs increased significantly the blastocyst rate compared to COCs from small follicles. In conclusion, additional OSFs secreted by DOs, improved blastocyst yield of oocytes coming from small follicles. However, not differences were found between OSFs secreted by small or large follicles of prepubertal goat oocytes.

Reproduction, Fertility and Development **22(1) 333–334 Published: 8 December 2009**

334 EFFECT OF A GROWTH MEDIUM DURING IVM ON EMBRYO DEVELOPMENT OF PREPUBERTAL EWE OOCYTES

M. G. Catalá [A], D. Izquierdo [A], R. Romaguera [A], M. Roura [A], M. T. Paramio [A]

Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

Abstract

The aim of this study was to assess the effect of an *in vitro* growth medium (De Wu *et al.* 2006 Biol. Rep. 75, 547-554) in prepubertal ewe oocytes selected by the brilliant cresyl blue (BCB) test. Prepubertal ewe oocytes were recovered by slicing ovaries of slaughtered animals and immediately exposed during 1 h to 13 µM BCB and classified according to their cytoplasm coloration (Rodriguez-Gonzalez E *et al.* 2002 Theri- ogenology 57(5), 1397-1409): BCB+ (blue cytoplasm, hypothetically grown oocytes) and BCB- (uncolored cytoplasm, hypothetically growing oocytes). Uncolored oocytes (BCB-) were matured using three culture media: growth medium (GM: TCM-199, 0.04 µg mL^{-1} FSH, 0.04 µg mL^{-1} LH, 0.004 µg mL^{-1} estradiol, 100 µg mL^{-1} ascorbic acid, and 5 µL mL^{-1} ITS: insulin transferrin selenium), conventional maturation medium (CM: TCM-199, 10 µg mL^{-1} FSH, 10 µg mL^{-1} LH and 1 µg mL^{-1} estradiol) and modified maturation medium (MM: CM with the addition of 100 µg mL^{-1} ascorbic acid and 5 µL mL^{-1} ITS). Oocytes were matured in GM for 12 h and then separated into 2 groups, CM (GM+CM) and MM (GM+MM) for another 12 h of maturation. Two extra groups of BCB- oocytes were directly cultured for 24 h in CM or MM media (BCB-/CM and BCB-/MM). Colored oocytes (BCB+) and a control group (oocytes not exposed to BCB) were matured for 24 h in CM. All groups were cultured at 38.5°C and 5% CO_2 in humidified atmosphere. Fertilization took place in SOF medium supplemented with 10% of estrous sheep serum during 20 h with a sperm concentration of 1×10^6 spermatozoa/mL. Presumptive zygotes were cultured for 8 days in SOF with 10% FCS at 38.5°C, 5% CO_2 and 5% O_2. Results are shown in Table 1. The percentage of morula plus blastocyst obtained from BCB - oocytes was significantly increased in oocytes exposed to growth medium (containing ITS, ascorbic acid and low hormone concentrations; groups GM+CM and GM+MM) for the first 12 h. An increasing tendency has also been observed in blastocyst yield in these two groups. Regarding maturation rate, no differences were found in all groups (data not shown). In conclusion, as De Wu *et al.* (2006) showed in prepubertal gilts, we also achieved some improvements in embryo development of growing oocytes when the first 12 h of maturation took place in a growth medium. However, embryo developmental potential of BCB- oocytes is still lower compared with that of BCB+ oocytes.

Reproduction, Fertility and Development **22(1) 323–324 Published: 8 December 2009**

104 SURVIVAL AND APOPTOSIS RATES AFTER VITRIFICATION OF EARLY, EXPANDED, AND HATCHED CALF AND COW BLASTOCYSTS *IN VITRO*-PRODUCED USING CRYOTOP AS A DEVICE

R. Morató [A], D. Izquierdo [A], M. T. Paramio [A], T. Mogas [A]

Universitat Aut?noma de Barcelona, Bellaterra, Spain

Abstract

Two experiments were designed to determine the ability of 7 and 8 day *in vitro*-produced blastocysts to survive to the vitrification procedure. Embryos were classified as early blastocysts, expanded, or hatching/hatched blastocysts. Vitrification was done using cryotop devices as described Du *et al.* (2007). After warming, blastocysts were incubated for 3 h in SOF medium. In the first experiment, we examined the developmental competence of early blastocysts, expanded blastocysts, and hatching/hatched blastocysts after vitrification using the Cryotop method. In the second experiment, warmed blastocysts that had been vitrified on cryotops were fixed in 4% formaldehyde and incubated with TUNEL staining for detecting DNA damaged nuclei. The percentage of TUNEL positive and negative blastomeres was assessed by confocal microscopy. In all experiments cow and calf blastocysts were compared. When the results according to the developmental stage were analyzed, no differences in the survival rates after vitrification of expanded and hatched blastocysts were observed at Day 8 from cow and calf blastocysts. After warming, survival rates of 52.4 and 50% were noted in the groups of expanded and hatched blastocysts respectively from Day 8 cow blastocysts. Similar results were observed in the groups of expanded (54.5%) and hatched (59.4%) blastocysts from Day 8 calf blastocysts. When embryos were vitrified at Day 7, survival rates of 78.4 and 66.7% were observed after warming expanded and hatched blastocysts from cows. In calves, a significant increase in the survival up to 83.3 and 80% was observed after warming expanded and hatched blastocysts. The lowest survival rates were observed in early blastocysts (from 26 to 51%), particularly in those vitrified at Day 8 (≤40%). Following vitrification, cell death was monitored in blastocysts 3 h after warming by TUNEL labelling of cells with damaged DNA. The TUNEL staining procedure was undertaken on Day 7 calf (n = 23) and cow (n = 25) blastocysts, as well as on Day 8 calf (n = 22) and cow (n = 30) blastocysts. When taking into account the stage of blastocyst development, there was a trend toward higher DNA integrity index after warming of expanded and hatched blastocysts compared with early blastocysts in calf and cow groups. So, cell damage was minimal in those blastocysts vitrified at expanded and hatched stage and rates were comparable with those from control fresh blastocysts. These findings suggest that the Cryotop technique seems to be particularly useful for blastocysts presenting a high degree of expansion (expanded and hatched blastocysts), mainly those blastocysts vitrified and warmed at Day 7.

Reproduction, Fertility and Development **22(1) 211–211** **22(1) 211–211**